

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA LOISE DE MORAIS CALADO

**MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO
ALAGADOS, SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM CIANOTOXINAS**

CURITIBA

2015

SABRINA LOISE DE MORAIS CALADO

**MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO
ALAGADOS, SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM CIANOTOXINAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO




PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Sabrina Loise De Moraes Calado** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2015.


BANCA EXAMINADORA:



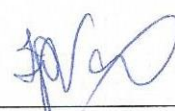
Prof. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Orientadora e Presidente



Prof. Dra. Valéria Freitas de Magalhães
Membro



Prof. Dr. Cesar A. da Silva
Membro

Visto: 

Profª. Dra. Isabela Galarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO



AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me deu forças para encarar todos os obstáculos;

À minha família, principalmente meu pai Sergio, minha mãe Lozangela e meus irmãos Sergio e Suelen, os quais sempre me apoiaram e me ajudaram em todos os momentos do mestrado;

À minha orientadora, Prof. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, a qual me deu a oportunidade, acreditou no meu trabalho e me ensinou muito;

As minhas amigas Ligie, Lilian, Maryana, Mardjory, Ana Maria e Solange, pela amizade, horas de estudo, descontração e palavras de incentivo;

À Prof. Dra. Valéria Freitas Magalhães, a qual me recebeu de braços abertos e me orientou nas análises realizadas na UFRJ. Além dos colegas de laboratório que me acolheram, principalmente ao Ricardo que me acompanhou nas análises, lamê, Luciane e Roberta que sempre estavam prontas para ajudar e me apresentaram a cidade maravilhosa;

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental Franciele Betim, João, Thalita, Mayara, Ana Carolina, Ana Paula, Franciele Mathias e principalmente a Cris e a Letícia as quais me ensinaram muito;

À amiga e colega de trabalho Juliana e ao Gustavo, os quais contribuíram diretamente para que este trabalho fosse realizado;

Ao Prof. Dr. André Padial e a amiga Bianca pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos pescadores Sadi, Telma, Roberto e Daniel, os quais estavam sempre dispostos nas coletas;

À todas as pessoas que direta ou indiretamente influenciaram no desenvolvimento deste trabalho e crescimento pessoal;

A Capes pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

A eutrofização, causada pelo enriquecimento de nutrientes, resulta em intensas florações de microalgas e cianobactérias. O reservatório Alagados em Ponta-grossa, PR é utilizado para geração de energia e para o abastecimento público de água, sendo que florações persistentes de cianobactérias potencialmente tóxicas nesta região vêm causando problemas ambientais, sociais e econômicos. O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade da água do reservatório Alagados, Paraná, Brasil, através da análise de cianotoxinas e de biomarcadores bioquímicos e genéticos. Foram realizadas quatro coletas para amostragem de água e duas coletas de *Geophagus brasiliensis*, no período de setembro de 2013 à maio de 2014. As amostras de água foram analisadas quantitativamente e qualitativamente quanto às cianobactérias e cianotoxinas PSTs (Paralytic Shellfish Toxins). Os peixes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi eutanasiado no dia da coleta, mensurado o peso e comprimento total, colhido o sangue e coletado o cérebro, o músculo e o fígado. O segundo grupo foi submetido ao experimento de depuração por 40 dias. Após os 40 dias, foram realizados os mesmos procedimentos que os do primeiro grupo. O sangue foi destinado às análises de biomarcadores genéticos, o músculo, cérebro e o fígado para as análises de biomarcadores bioquímicos. Uma amostra do músculo também foi retirada para análises químicas de cianotoxinas. A cianobactéria dominante na água do reservatório foi a *Cylindrospermopsis raciborskii*, apresentando densidade sempre acima do limite estabelecido de 20,000 céls/mL. As concentrações de PSTs na água também estiveram acima do estabelecido pela legislação (3µg/L). No músculo dos peixes houve acúmulo destas toxinas, e mesmo após 40 dias em água limpa não foi observado a completa depuração das toxinas. Os biomarcadores bioquímicos e genéticos apresentaram uma diferença significativa entre os peixes eutanasiados no dia de coleta em relação os peixes da depuração. Essa diferença sugere a recuperação do sistema antioxidante assim como a redução do dano celular após 40 dias em água limpa. O fator de condição e o índice hepatossomático foram menores nos peixes da segunda coleta, na qual também a concentração de cianotoxinas foi maior. Os resultados sugerem que o reservatório Alagados apresenta uma persistente contaminação de cianotoxinas. Além disso a mistura de contaminantes que pode estar presente neste corpo hídrico pode explicar as respostas sazonais nos peixes nos diferentes pontos amostrados.

Palavras-chave: *Cylindrospermopsis raciborskii*; PSTs; *Geophagus brasiliensis*; Biomarcadores.

ABSTRACT

Eutrophication, caused by high nutrients loads increases microalgae and cyanobacteria blooms. The Alagados reservoir in Ponta Grossa, PR is an important source of water supply and power generation. Blooms of toxic cyanobacteria in this area has caused environmental, social and economic problems. This study aim to monitor the water quality of the Alagados reservoir, Paraná, Brazil, through cyanotoxin analysis and biochemical and genetic biomarkers. For this purpose, four water samples and two samples of *Geophagus brasiliensis* were collected during September 2013 until May 2014. The water samples was analyzed quantitatively and qualitatively in respect to the cyanobacteria and cyanotoxins PSTs (Paralytic Shellfish Toxins). The fish were divided in two main groups. The first one was euthanized after been sampled, then their weight and length were measured and the blood, brain, muscle and liver were collected. The second group was submitted to depuration experiment for 40 days. After that, the same procedures of the first group were carried out. Blood samples were used for the genetic biomarkers; muscle, brain and liver samples for biochemical biomarkers analysis. A muscle sample was also collected for chemical analysis of cyanotoxins. The dominant cyanobacteria in the water of the reservoirs was *Cylindrospermopsis raciborskii*, with a density above the recommended limit of 20,000 cels/ml. The PSTs concentrations in water also exceed the limits of the established by legislation (3µg/L). In the muscle samples occurred the accumulation of these toxins and even after 40 days in clean water was not observed a complete elimination. The biochemical and genetic biomarkers showed a significant difference between the fish collected and euthanized and the depuration group, this difference suggests a recovery of the antioxidant system and a reduction of cellular damage after 40 days in clean water. The condition factor and the hepatosomatic index were lower in the fish of the second sampling, which the concentration of cianotoixinas was higher. The results suggested that Alagados reservoir has a persistent contamination of cyanotoxins. Moreover the mixture of contaminants which may be present in the water body can explain the sazonnally in fish in the sampled points.

Key-words: *Cylindrospermopsis raciborskii*; PSTs; *Geophagus brasiliensis*; Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A: Mapa do estado do Paraná com a localização do reservatório Alagados B: Margem do reservatório alagados, mostrando a ocupação humana e a prática agrícola no seu entorno.....	17
FIGURA 2: Estrutura geral das saxitoxinas e grupamentos químicos variáveis. STX- Saxitoxina; GTX- Gonautoxinas; C- C-toxinas; neoSTX- neosaxitoxina; dcSTX- Decarbamoilsaxitoxina; dcGTX- Decarbamoilgonautoxina; LWTX- toxinas de <i>Lyngbya wollei</i>	20
FIGURA 3: Densidade de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> no reservatório Alagados de janeiro de 2002 à fevereiro de 2011.....	24
FIGURA 4: Espécie de peixe <i>Geophagus brasilienses</i> do reservatório Alagados.....	26
FIGURA 5: Alterações Morfológicas Nucleares.....	31
FIGURA 6: Mapa do Reservatório Alagados e pontos de coleta de água e peixes da espécie <i>Geophagus brasiliensis</i>	34
FIGURA 7: Densidade de espécies de fitoplâncton (cél/mL.10 ⁴) do reservatório Alagados no período de setembro de 2013 à maio de 2014.....	47
FIGURA 8: Porcentagem (%) de organismos com a presença de PSTs em cada grupo.....	49
FIGURA 9: Fator de condição A e índice hepatossomático B em <i>Geophagus brasiliensis</i>	50
FIGURA 10: Atividade da Acetilcolinesterase cerebral A , B e C em <i>Geophagus brasiliensis</i>	51

FIGURA 11: Atividade da Acetilcolinesterase muscular A, B e C em <i>Geophagus brasiliensis</i>	52
FIGURA 12: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Etoxiresorufina- O-deetilase (EROD) A, B e C	53
FIGURA 13: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Glutathione S-transferase (GST) A, B e C	54
FIGURA 14: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Superóxido dismutase (SOD) A, B e C	55
FIGURA 15: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Catalase (CAT) A, B e C	56
FIGURA 16: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Glutathione peroxidase (GPx) A, B e C	57
FIGURA 17: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Glutathione reduzida (GSH) A, B e C	58
FIGURA 18: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Lipoperoxidação lipídica (LPO) A, B e C	59
FIGURA 19: Biomarcadores bioquímicos em fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Carbonilação de proteínas (PCO) A, B e C	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TOXICIDADE RELATIVA DAS PSTs ANALISADAS.....	37
TABELA 2: TEMPERATURA, PH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO NOS TRÊS PONTOS DE COLETA.....	43
TABELA 3: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO INVERNO (SETEMBRO) 2013.....	44
TABELA 4: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NA PRIMAVERA (NOVEMBRO) 2013.....	44
TABELA 5: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DE FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO VERÃO (MARÇO) 2014.....	45
TABELA 6: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO OUTONO (MAIO) 2014.....	46
TABELA 7: CONCENTRAÇÕES DE PSTs NA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS QUATRO ESTAÇÕES E NOS TRÊS PONTOS DE COLETA.....	48
TABELA 8: CONCENTRAÇÕES DE STX, GONIAUTOXINAS (1, 2, 3 E 4) E PSTS TOTAIS NO MÚSCULO DOS PEIXES.....	50
TABELA 9: MICRONÚCLEO PÍSCIO E ALTERAÇÕES NUCLEARES DOS PEIXES <i>Geophagus brasiliensis</i>	62

LISTA DE SIGLAS

Ach= Acetilcolina

AChE= Acetilcolinesterase

ANA-a= Anatoxina

BSA= Soro albumina bovina

CAT= Catalase

CDNB= 2,4-Dinitrochlorobenzeno

COPEL= Companhia Paranaense de Energia

CYL= Cilindrospermopsina

CYP1A= Citocromo P450 família 1A

DNA= Ácido desoxidoribonucléico

DNPH= 2,4-Dinitrophenylhydrazina

DTNB= Ácido 5,5'-ditiobis-2- ácido nitrobenzóico

EROD= Etoxiresorufina-O-deetilase

EROs= Espécies reativas de oxigênio

GPx= Glutathione Peroxidase

GR= Glutathione reductase

GSH= Glutathione reduzida

GSSG= Glutathione oxidada

GST= Glutathione S-transferase

GTX= Goniatóxina

H₂O₂= Peróxido de hidrogênio

HCL= Ácido clorídrico

HO= Radical hidroxil

HPLC= Cromatografia líquida de alta eficiência

IAP= Instituto Ambiental do Paraná

IHS= Índice Hepatossomático

K= Fator de Condição

LPO= Lipoperoxidação

NADPH= Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBT= Nitroazul de Tetrozólíio

$O_2^{\bullet -}$ = Radical ânion superóxido

PAHs= Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PCBs= Bifenilas policloradas

PCDF= Policlorinados dibenzofuranos

PCE= Eritrócito policromático

PCO= Carbonilação de proteínas

PST= Paralytic Shellfish Toxins

SANEPAR= Companhia de Saneamento do Paraná

SOD= Superóxido dismutase

STX= Saxitoxina

TCA= Ácido tricloroacético

TCB= Triclorobenzeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Reservatório Alagados	16
2.2 Cianobactérias	18
2.3 Cianotoxinas	18
2.3.1 Saxitoxinas (PSTs)	19
2.4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	22
2.5 Bioacumulação, Biomagnificação e Biotransformação de compostos tóxicos	24
2.6 Biomonitorios	25
2.6.1 Espécie do estudo (<i>Geophagus brasiliensis</i>)	25
2.7 Biomarcadores	26
2.7.1 Biomarcadores bioquímicos	27
2.7.2 Biomarcadores genéticos	30
2.7.2.1 Micronúcleo Píscio e Alterações Morfológicas Nucleares	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Coleta de Dados	33
4.2 Fator de Condição (K)	34
4.3 Índice Hepatossomático	35
4.4 Experimentos Laboratoriais	35
4.4.1 Experimentos de depuração	35
4.4.2 Análises Quantitativas e Qualitativas do Fitoplâncton	36
4.4.3 Análises Químicas	36
4.4.3.1 Água	37
4.4.3.2 Músculo	37
4.5 Biomarcadores Bioquímicos	38
4.5.1 Concentração proteica	38
4.5.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	38
4.5.3 Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	39
4.5.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)	39
4.5.5 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)	39
4.5.6 Atividade da Catalase (CAT)	40
4.5.7 Atividade da Glutathione peroxidase (GPx)	40
4.5.8 Concentração de Glutathione reduzida (GSH)	40
4.5.9 Lipoperoxidação (LPO)	41
4.5.10 Carbonilação de proteínas (PCO)	41
4.6 Biomarcadores Genéticos	42
4.6.1 Micronúcleo Píscio e Alterações Morfológicas Nucleares	42

4.7 Análises Estatísticas	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Análise da água	43
5.2 Análise de PSTs no músculo dos peixes <i>Geophagus brasiliensis</i>	49
5.3 Fator de condição (K) e índice hepatossomático (IHS)	50
5.4 Biomarcadores bioquímicos	51
5.4.1 Neurotoxicidade	51
5.4.2 Biotransformação/estresse oxidativo	53
5.5 Biomarcadores genéticos	61
5.5.1 Genotoxicidade	61
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Cianobactérias	63
6.2 PSTs	65
6.3 Biomarcadores bioquímicos	68
6.3.1 Neurotoxicidade	68
6.3.2 Biotransformação/estresse oxidativo	68
6.4 Genotoxicidade	70
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural finito fundamental para a existência de todos os seres vivos. No entanto, este recurso tem sido cada vez mais degradado pela ação humana e as práticas voltadas para a sua conservação são ainda limitadas (MERTEN; MINELLA, 2002). Os ecossistemas aquáticos são definidos como sumidouros, pois os mesmos recebem diferentes substâncias provenientes da drenagem e lixiviação do ambiente terrestre. As principais atividades antropogênicas que têm alterado os ecossistemas aquáticos estão relacionadas à industrialização, construções de reservatórios, atividades agrícolas e a ocupação humana no entorno destes corpos d' água, os quais têm contribuído para a desestruturação da dinâmica das comunidades biológicas (GOULART; CALLISTO, 2003).

Alguns ecossistemas aquáticos são construídos para suprir a necessidade de energia e água. Os reservatórios são lagos artificiais que ao serem construídos interferem na manutenção da integridade biótica dos sistemas dulcícolas (RODGHER *et al.*, 2005). No entanto, estes sistemas podem também ser considerados ambientes abertos pertencentes às bacias hidrográficas, sendo que os mesmos são fortemente influenciados e dependentes de trocas de matéria e energia com a bacia e o ambiente em seu entorno (NAKAMURA; RAST, 2011).

Os reservatórios vêm sendo amplamente utilizados pelo homem para a geração de energia, abastecimento público de água, recreação e paisagismo. Portanto, esses corpos d' água podem estar sujeitos à entrada de diversas substâncias tóxicas, devido à práticas agrícolas, descarga de esgoto e lixiviação (PALMA *et al.*, 2010).

Os principais problemas ambientais em reservatórios são decorrentes da eutrofização. A eutrofização pode ocorrer de maneira natural, mas vem sendo agravada por ações antropogênicas. Esse processo compromete a qualidade da água e aumenta o custo do tratamento a fim de torna-lá potável (CHORUS; BARTRAM, 1999). Esse fenômeno é provocado pelo enriquecimento excessivo de matéria orgânica e nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio que são fatores limitantes para o crescimento de algas e plantas aquáticas. Portanto, o efeito mais comum causado pelo enriquecimento de nutrientes nos ambientes

aquáticos é o aumento da abundância desses organismos na coluna d' água (SMITH; TILMAN; NEKOLA, 1999). A proliferação de algas e plantas contribui para a diminuição do oxigênio dissolvido, morte da biota aquática e diminuição na riqueza de espécies (RAST; STRASKRABA, 2001)

Entre as algas que compõem o fitoplâncton, as cianobactérias são as que causam maiores problemas ambientais e econômicos, principalmente, devido à produção de toxinas. Essas toxinas, denominadas cianotoxinas, são classificadas de acordo com a sua toxicidade e podem ser nocivas para os organismos aquáticos (KAEBERNICK; NEILAN, 2001).

Florações de cianobactérias, como a *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Dolichospermum* spp., tem sido detectadas no reservatório Alagados localizado no estado do Paraná. Estas cianobactérias são potencialmente produtoras de neurotoxinas, sendo que um estudo recente relatou concentrações destas toxinas na água e no músculo dos peixes (CLEMENTE *et al.*, 2010).

Devido ao grau de toxicidade que a comunidade fitoplanctônica pode apresentar a biota aquática, a avaliação da contaminação da água deve levar em conta, não apenas a sua caracterização físico-química e microbiológica, mas também análises biológicas, visto que estas podem fornecer uma figura incompleta da real situação do ambiente. As análises biológicas devem ser adicionadas ao monitoramento, permitindo uma avaliação que integra a qualidade da água e seus efeitos tóxicos para a população humana e as comunidades aquáticas (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004). A implementação de estratégias mais eficazes nos programas de avaliação da qualidade da água em reservatórios é importante, visto que algumas metodologias no sistema de tratamento de água têm sido ineficazes na remoção de alguns contaminantes como por exemplo fármacos e metais pesados, podendo até mesmo aumentar a genotoxicidade destes compostos (PALMA *et al.*, 2010).

A utilização deste tipo de estratégia permite uma avaliação geral dos efeitos das substâncias na água, além dos seus efeitos sinérgicos e/ou antagônicos (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004). Sendo assim, o monitoramento de corpos de água a partir de análises biológicas pode determinar os reais riscos para a saúde humana e para o meio ambiente (VARGAS; MIGLIAVACCA; TERRA, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Reservatório Alagados

O reservatório Alagados está localizado no segundo planalto do estado do Paraná, na cidade de Ponta Grossa (FIGURA 1). O reservatório foi construído em 1929, a partir do represamento do Rio Pitangui, e ampliado em 1945, com a hidroelétrica São Jorge operada pela Companhia Paranaense de Energia (COPEL). A partir de 1977, o reservatório passou a ser responsável pelo abastecimento público de água da cidade de Ponta Grossa e, atualmente, abastece também as cidades de Castro e Carambeí (NUCLEAM, 2002).

A bacia hidrográfica do rio Tibagi, a qual o reservatório Alagados pertence, é limitada pelas coordenadas geográficas 24° 52' a 25° 05' de latitude e 49° 46' a 50° 06' de longitude de Greenwich. Apresenta uma profundidade média de 4 m e vazão média de 9,4 m³/s (NUCLEAM, 2002).

O reservatório é intensamente utilizado para a recreação, sendo que tais atividades antrópicas vêm causando a degradação deste corpo hídrico. Além das atividades agrícolas e do entorno, o Instituto Ambiental do Paraná (IAP) considera o reservatório moderadamente degradado (Classe III), por apresentar déficit de oxigênio dissolvido, médio aporte de nutrientes e matéria orgânica, tendência moderada à eutrofização e tempo de residência considerável (IAP, 2004).

Em resultado da eutrofização, desde 2002 são relatadas intensas florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nesse reservatório, principalmente florações persistentes de *Cylindrospermopsis raciborskii* (YUNES *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2003). Estudos recentes detectaram altas densidades de cianobactérias e concentrações de cianotoxinas (LAGOS, 2008; CLEMENTE *et al.*, 2010; WOJCIECHOWSKI, 2013) mostrando a necessidade de um monitoramento efetivo da qualidade da água.

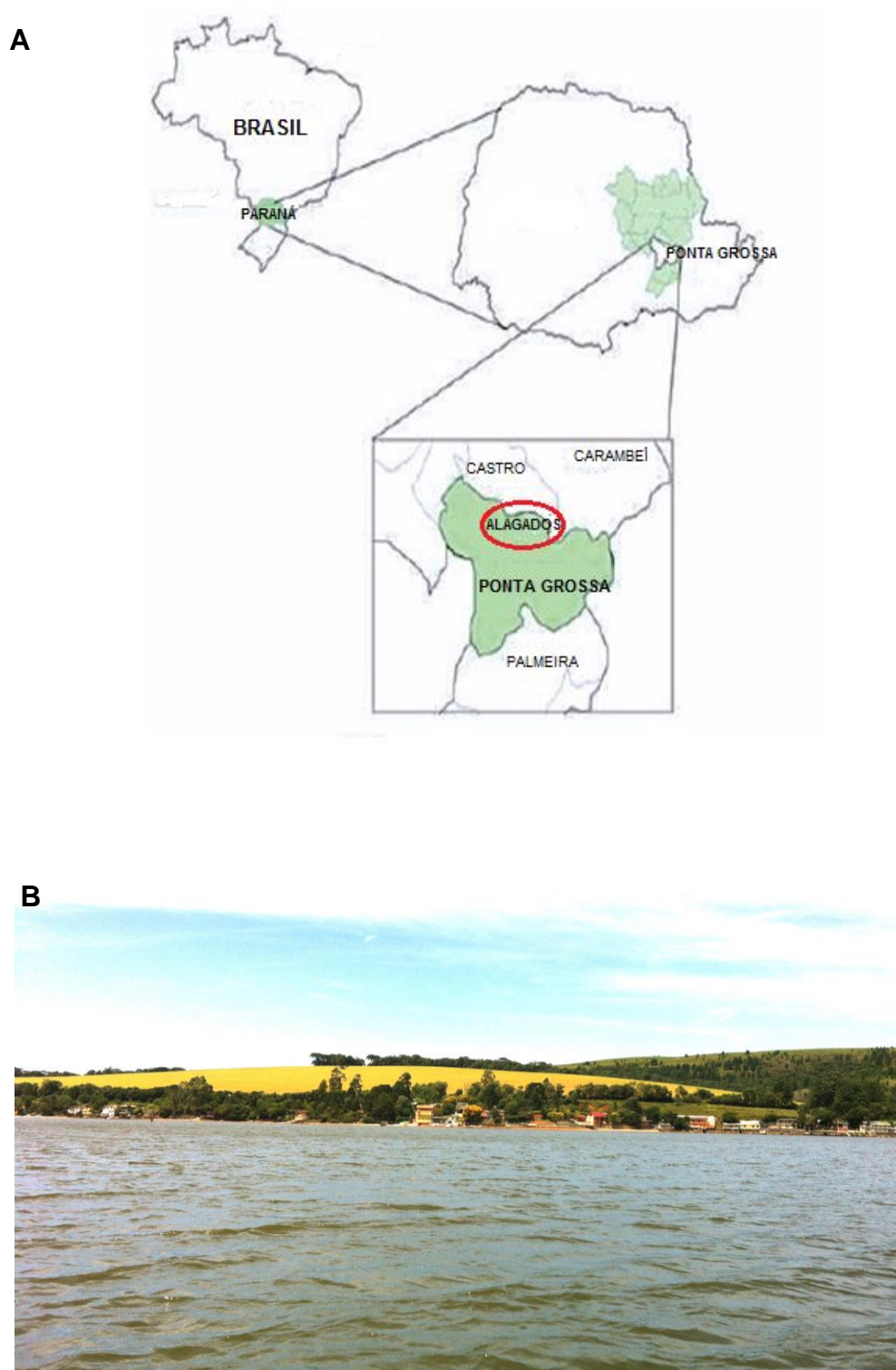


FIGURA 1: **A:** Mapa do estado do Paraná com a localização do reservatório Alagados (ROCHA; MARTINS, 2011). **B:** Margem do reservatório alagados, mostrando a ocupação humana e a prática agrícola no seu entorno. FONTE: O autor (2015)

2.2 Cianobactérias

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são microrganismos procariontes, fotoautotróficos, aeróbicos e estão distribuídos nos ambientes terrestres e aquáticos (Codd *et al.*, 1999). Estes organismos são considerados importantes contribuintes na formação de oxigênio na atmosfera terrestre assim como na fixação de nitrogênio (Merel *et al.*, 2013).

Entretanto, em resultado a eutrofização natural ou por influência humana, estes organismos vêm formando grandes florações, as quais causam problemas econômicos, sociais e ambientais (Carmichael, 2012). As florações de cianobactérias em lagos e reservatórios são favorecidas, principalmente, por três fatores ambientais: a alta temperatura da água, intensidade luminosa geralmente alta e maior concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio. Segundo Codd *et al.* (1994) e Carmichael (2012), muitas cianobactérias são identificadas como produtoras de cianotoxinas capazes de causar problemas na qualidade da água, elevados custos de tratamento, danos a saúde ou até a morte da biota aquática e da população humana.

Em função dos problemas causados pelas florações de cianobactérias, faz-se necessária a identificação desses organismos no ambiente e o monitoramento de sua abundância. Entretanto, apenas com a utilização de técnicas qualitativas e quantitativas não é possível saber se as cianobactérias estão produzindo toxinas, desta maneira, análises químicas da água devem ser realizadas (Merel *et al.*, 2013).

A densidade de cianobactérias estabelecida pelo Ministério da Saúde, Portaria nº 2914/2011 é de 20,000 céls/mL para águas de contato primário e estabelecido como limite aceitável no ponto de captação de água para consumo humano. Quando as florações estão acima deste valor é necessário o monitoramento semanal de cianobactérias e cianotoxinas.

2.3 Cianotoxinas

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são chamadas de cianotoxinas e classificadas de acordo com sua estrutura molecular e sua toxicidade em neurotoxinas, dermatoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas, toxinas

irritantes e outros compostos inalantes (CHORUS; BARTRAM, 1999). A exposição da biota aquática a estas toxinas pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados, o contato com a água contaminada e também a sua ingestão.

Os humanos também estão sujeitos à exposição a estes metabólitos de três maneiras: a primeira é através da ingestão de alimentos contaminados como, por exemplo, mariscos que bioacumulam as toxinas em seus tecidos. A segunda forma de exposição é o contato do corpo e da pele do indivíduo com a floração ou a água contaminada em atividades de recreação; a terceira é com exposições intravenosas e intranasais; e a última forma de exposição é a ingestão direta da água contaminada, sendo esta a maneira que atinge um maior número de pessoas, principalmente quando não é realizado um tratamento eficiente para a remoção destes compostos (MERELE *et al.*, 2013).

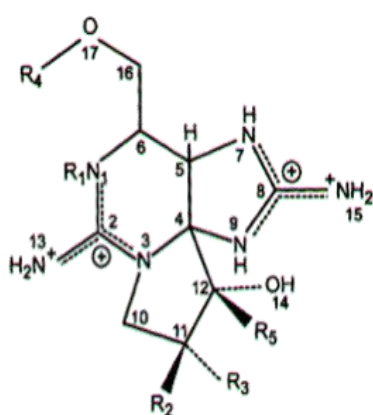
O primeiro relato sobre os efeitos tóxicos de cianotoxinas foi feito pelo pesquisador George Francis (1878), após a morte de gado no sul da Austrália, depois de terem consumido a água contaminada do Lago Alexandria. No Brasil o primeiro relato de casos letais em humanos por cianotoxinas ocorreu pela exposição intravenosa em uma clínica de hemodiálise em Caruarú, Pernambuco em 1996. A morte de 131 pacientes ocorreu devido a intoxicação por hepatotoxinas, causando insuficiência hepática (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

O Ministério da Saúde, Portaria 2914/2011, determina os limites máximos permitidos para a concentração de microcistinas ($1\mu\text{g/L}$), cilindrospermopisina ($1\mu\text{g/L}$) e saxitoxinas ($3\mu\text{g/L}$) para água potável de consumo humano. Porém, ainda não existe no Brasil uma legislação que determine as concentrações máximas permitidas para as demais cianotoxinas.

2.3.1 Saxitoxinas (PSTs)

As saxitoxinas (STXs) denominadas Paralytic Shellfish Toxins – PSTs, são neurotoxinas que bloqueiam canais de sódio, impossibilitando a transmissão do impulso nervoso (CARMICHAEL, 1994). Além disso, o bloqueio dos canais de sódio pode causar danos a permeabilidade da membrana, alterando a homeostase celular (HILLE, 1992). Existem mais de 20 análogos

de STX descritos, divididos em quatro grupos de magnitude e toxicidade (OSHIMA; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1993; KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Esse agrupamento vai depender do grupamento ligado a sua cadeia, podendo ser: decarbamoil, hidroxil e sulfato (OSHIMA; BLACKBURN; HALLEGRAEFF, 1993; CHORUS; BARTRAM, 1999). O primeiro grupo é considerado o mais tóxico e compreende as saxitoxinas (decarbamoilsaxitoxona, saxitoxina, decarbamoilneosaxitoxina e neosaxitoxina). O segundo grupo é composto por toxinas sulfatadas, estas são consideradas menos potentes que as saxitoxinas (Goniautoxinas 1-6). O terceiro grupo é composto por toxinas duplamente sulfatadas, elas são menos potentes que os dois grupos anteriores (C-toxinas 1-4). O último grupo é composto por variedades de cepas americanas de *Lyngbya wollei* 1-6 (FIGURA 2) (NEGRI; JONES, 1995; BRIAND *et al.*, 2003; ARAÓZ; MOLGO; MARSAC, 2010).



Nome da toxina	Grupos químicos variáveis nas toxinas				
	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	H	CONH ₂	OH
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂	OH
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
LWTX1	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	H
LWTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	OH
LWTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	COCH ₃	OH
LWTX4	H	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH ₃	OH
LWTX6	H	H	H	COCH ₃	H

FIGURA 2: Estrutura geral das saxitoxinas e grupamentos químicos variáveis. STX- Saxitoxina; GTX- Goniautoxinas; C- C-toxinas; neoSTX- neosaxitoxina; dcSTX- Decarbamoilsaxitoxina; dcGTX- Decarbamoilgoniautoxina; LWTX- toxinas de *Lyngbya wollei*. (Modificado de Freitas, 2007).

A DL50 em camundongos para saxitoxina via intraperitoneal é de 10 µg/kg e para via oral é de 260 µg/kg (ARAÓZ; MOLGO; MARSAC, 2010; CHORUS; BARTRAM, 1999). Um estudo realizado em ratos com a concentração de 3 µg/L (equiv.STX), mostraram um efeito crônico significativo nas defesas antioxidantes e a indução de estresse oxidativo (RAMOS *et al.*, 2014).

Os peixes podem bioacumular estas toxinas quando presentes no ambiente aquático, causando perda do equilíbrio e até a morte do animal (WHITE, 1984). Intoxicações relatadas em humanos causam sensações de queimação, salivação, vômito, diarreia ou, até mesmo, reações letais dependentes da quantidade ingerida (LLEWELLYN, 2006; CARMICHAEL, 2012). As toxinas podem persistir por mais de 90 dias na água doce, podendo ser modificadas devido o aumento de temperatura da água e também degradada na presença de outras formas mais tóxicas (JONES; NEGRI; 1997).

Estudos que avaliaram a exposição das saxitoxinas evidenciaram o dano às moléculas de lipídios, proteínas e DNA em peixes, sua distribuição em diferentes órgãos em gatos, a indução do citocromo P450 (CYP1A) na espécie de peixe *Salmo salar* e a mortalidade de ovelhas na Austrália (NEGRI; JONES; HINDMARSH, 1995; ANDRINOLO *et al.*, 1999; GUBBINS *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011)

As goniatoxinas (GTXs) são as toxinas mais abundantes em mariscos (ANDRINOLO *et al.*, 2002). Os epímeros GTX2 e GTX3 são altamente absorvidos pelo epitélio intestinal, em humanos esta absorção ocorre através de difusão simples, demonstrando uma fácil contaminação quando estas toxinas estão presentes no ambiente (MARDONES *et al.*, 2004). Em comparação com a saxitoxina e a neosaxitoxina ela apresenta menor toxicidade e entre as GTXs, a toxicidade diminui na seguinte sequência: GTX1>GTX2>GTX3>GTX4>GTX5>GTX6. Apesar de ser considerada menos tóxica, estudos já demonstraram alta toxicidade para mariscos (COMPAGNON *et al.*, 1998; ANDRIOLLO *et al.*, 2002). Um problema é a falta de literatura que determine a real toxicidade das GTXs, pois a maioria das pesquisas demonstra efeitos tóxicos de equivalente de STX.

Florações persistentes da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de PSTs em ecossistemas aquáticos, bem como em reservatórios

(MORO *et al.*, 2003; LAGOS *et al.*, 1999; WOJCIECHOWSKI, 2013), podem resultar na bioacumulação de STX e goniatoxinas nos tecidos da biota aquática (CLEMENTE *et al.*, 2010) e causar a deficiência do sistema antioxidante em células cerebrais de peixes (SILVA *et al.*, 2011).

Devido aos problemas que estas toxinas podem causar no ecossistema e para a saúde humana, o limite de saxitoxina para água de consumo humano foi primeiramente sugerido por Fitzgerald, Cunliffe, Burch (1999), determinando 3 µg/L (equiv. STX). Depois, este limite foi adotado pela legislação brasileira (portaria 2914/2011).

2.4 *Cylindrospermopsis raciborskii*

A *Cylindrospermopsis raciborskii* Seenayya et Subba Raju, é uma cianobactéria planctônica de águas continentais que pode produzir cepas tóxicas e não tóxicas (MIHALI *et al.*, 2008). Esta cianobactéria é uma alga filamentosa, altamente invasiva e, além disso, cosmopolita, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, isso faz com que a contaminação da água pela presença desta espécie seja um importante problema para a saúde global (BICUDO; MENEZES, 2005).

Esta cianobactéria foi primeiramente isolada em lagos na Indonésia e foi considerada não tóxica por um longo tempo (KOMÁRKOVÁ; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999). *Cylindrospermopsis raciborskii* pode produzir vários metabólitos secundários tóxicos, dentre eles o alcaloide hepatotóxico representado pela cilindrospermopsina (CYL) (HAWKINS *et al.*, 1985), os neurotóxicos representado pelas saxitoxinas (STX, neoSTX, goniatoxinas e C-toxinas) (LAGOS *et al.*, 1999) e anatoxinas (ANA-a) (CHORUS; BARTRAM, 1999) e os análogos não identificados (SAKER *et al.*, 2003).

O mais severo caso de intoxicação em humanos por estas cianotoxinas foi em 1979 “Palm Island Mystery Disease” afetando 138 crianças e 10 adultos. A população intoxicada apresentou hepatoenterite, disfunção renal e diarreia (BYTH, 1980). Outro caso de saúde pública envolvendo *Cylindrospermopsis raciborskii* ocorreu em 1995 em um reservatório em Queensland e causou a interrupção do abastecimento público de água da cidade de Brisbane

(HAWKINS *et al.*, 1997). No Brasil, em 1991, no lago Paranoá, Brasília, a floração de cepas não tóxicas também causaram grande prejuízo no uso da água para recreação e abastecimento público (BRANCO; SENNA, 1991).

Esta cianobactéria está presente em diferentes ambientes, principalmente rios e reservatórios, os quais apresentam uma grande diversidade na geomorfologia e na química da água. A plasticidade ecofisiológica de *C. raciborskii* resulta em uma alta habilidade de adaptação da espécie em diferentes regiões do globo (PADISÁK, 1997). As características adaptativas de *C. raciborskii* conferem vantagem adaptativa frente a outros produtores primários. Entre essas características estão a alta competitividade, resistência à herbivoria pelo zooplâncton (FULTON; PAERL, 1987), fixação de nitrogênio atmosférico, alta afinidade e capacidade de estocar fósforo e tolerância ao sombreamento (BRIAND *et al.*, 2002). Além disso, alguns estudos consideram essa cianobactéria como uma boa bioindicadora de mudança climática em regiões temperadas (PADISÁK, 1997; SINHA *et al.*, 2012; WOOD *et al.*, 2014).

No reservatório Alagados, desde 2002 têm sido evidenciadas intensas florações de *C. raciborskii*, com densidades acima do estabelecido pela legislação 2914/2011 (20,000 céls/mL), chegando à necessidade de interrupções no abastecimento público de água (FIGURA 3). Desta maneira, a presença desta espécie prejudica a integridade do ecossistema e da saúde local. Para evitar possíveis intoxicações, é necessário evitar a presença destas florações (YUNES *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2005; CLEMENTE *et al.*, 2010).

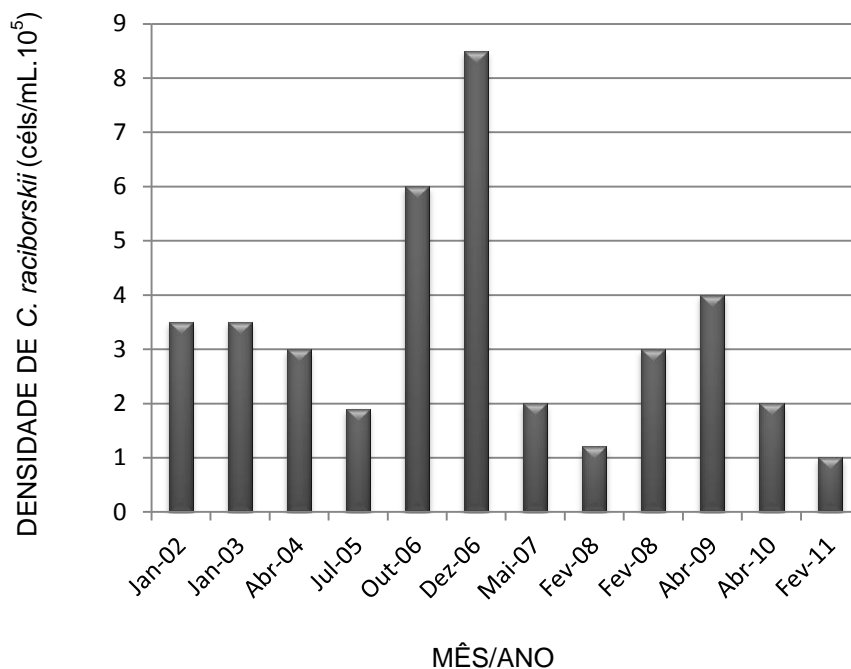


FIGURA 3: Densidade de *Cylindrospermopsis raciborskii* (célis/mL.10⁵) no reservatório Alagados de janeiro de 2002 à fevereiro de 2011 (Dados compilados de IAP, 2007; CLEMENTE *et al.*, 2010; WOJCIECHOWSKI, 2013).

2.5 Bioacumulação, Biomagnificação e Biotransformação de compostos tóxicos

Os compostos tóxicos, como as cianotoxinas, presentes nos ecossistemas aquáticos podem permanecer por um longo período no ambiente. Portanto, estes compostos são chamados de persistentes e podem apresentar um elevado potencial de toxicidade para a biota aquática. Segundo Matsui (2002), a persistência destas substâncias contribui para a sua adsorção no sedimento, bioacumulação na biota aquática e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.

A bioacumulação é o processo no qual uma determinada substância é absorvida e acumulada nos tecidos dos organismos, sendo assim, este processo pode ocorrer através da água ou pela ingestão de alimento. No entanto, a bioacumulação ocorrerá quando a taxa de assimilação exceder a taxa de eliminação dos compostos pelo organismo (BORGIA; SOUZA, 2001). Portanto, este processo pode resultar na biomagnificação, que é o aumento da concentração ao longo da cadeia alimentar, ou seja, os organismos de topo de

cadeia podem acumular concentrações muito elevadas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

Os organismos apresentam uma ferramenta que auxilia no processo de depuração destes xenobióticos, a qual é conhecida como biotransformação (PARKINSON, 2001). A biotransformação ocorre principalmente no fígado, submetendo compostos a reações químicas, geralmente, mediadas por enzimas, com a finalidade de originar metabólitos hidrossolúveis que são mais rapidamente eliminados. A biotransformação, além de auxiliar no processo de depuração, diminuindo a toxicidade de compostos, pode também converter substâncias de maneira que a sua toxicidade seja aumentada (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

2.6 Biomonitores

Os organismos que fornecem respostas qualitativas e quantitativas as alterações ambientais são chamados biomonitores. A vantagem do biomonitor está pela estreita relação entre ele e o ecossistema estudado. Por estar constantemente exposta as condições físicas e químicas do ambiente, a biota dos ecossistemas aquáticos pode ser considerada um bom biomonitor de qualidade ambiental (MARKERT, 1993). Os peixes são bons biomonitores por estarem em contato direto com o ambiente aquático, apresentarem ampla distribuição geográfica, além de bioacumularem e biomagnificarem compostos (JHA, 2004; KUNIYOSHI, 2011)

2.6.1 Espécie do estudo (*Geophagus brasiliensis*)

A espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* (FIGURA 4) popularmente conhecida como Cará ou Acará, apresenta ampla distribuição geográfica, com preferência por ambientes lênticos, sendo facilmente encontrada em reservatórios (ABELHA; GOULART, 2004). Quanto ao hábito alimentar, esta espécie é onívora, podendo se alimentar de detritos, sedimento, peixes, microcrustáceos e larvas de insetos (PARAGUASSÚ; ALVES; LUQUE, 2005). Devido a suas características ecológicas e geográficas, estudos têm utilizado

essa espécie como modelo biológico (WILHELM FILHO *et al.*, 2001; CLEMENTE *et al.*, 2010).



FIGURA 4: Espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* do reservatório Alagados eutanasiado por secção medular. FONTE: O autor (2015)

2.7 Biomarcadores

Além do uso de bioindicadores, muitos trabalhos têm reportado a importância do uso de biomarcadores (CLEMENTE *et al.*, 2010; YAMAMOTO, 2011; SILVA *et al.*, 2011). Estes biomarcadores podem descrever os efeitos causados por estresse ambiental nos diferentes níveis biológicos. Os biomarcadores são frequentemente utilizados para identificar alterações subletais causadas por contaminantes (LAM; GRAY, 2003). A utilização deles é considerada vantajosa por permitir que a presença de contaminantes seja detectada antes que possam causar efeitos adversos nos organismos, permitindo assim uma ação preventiva para a conservação dos ecossistemas (LIVINGSTONE, 1993).

Existem vários tipos de biomarcadores, dentre eles estão os bioquímicos, genéticos, morfológicos e os hematológicos, os quais têm sido usados como importantes ferramentas para avaliar efeitos da exposição dos organismos a poluentes (GUILOSKI *et al.*, 2013; SILVA DE ASSIS *et al.*, 2013).

2.7.1 Biomarcadores bioquímicos

A acetilcolinesterase é um biomarcador bioquímico que pode ser utilizado para avaliar a neurotoxicidade, pois esta enzima atua nas sinapses nervosas, fazendo a hidrólise da acetilcolina (ACh) e auxiliando na transmissão de impulsos nervosos (VIRGENS, 2009). Muitos trabalhos utilizando peixes já mostraram a inibição desta enzima quando exposta a agrotóxicos organofosforados, mesmo em pequenas concentrações (CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2005; GUILOSKI *et al.*, 2013). Outro contaminante que também pode inibir a atividade desta enzima é a cianotoxina anatoxina (MAHMOOD; CARMICHAEL, 1987).

O mecanismo de biotransformação é dividido em duas fases. A fase I é aquela onde vão ocorrer reações de oxidação, redução e hidrólise. Os produtos formados por estas reações podem ser mais reativos que os compostos anteriores. Na fase II ocorre as reações de conjugação, que tem como objetivo realizar a eliminação destes compostos para fora da célula (PARKINSON, 2001).

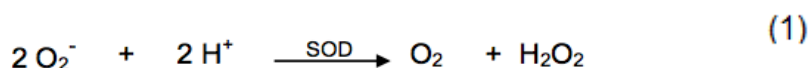
O mecanismo de biotransformação é mediado por enzimas, sendo as enzimas do citocromo P450 os principais componentes responsáveis pela fase I. A principal subfamília responsável pela biotransformação de xenobióticos é a CYP1A. A atividade catalítica desta subfamília pode ser medida pela Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD). Muitos trabalhos têm demonstrado a indução da atividade da CYP1A pela exposição a poluentes orgânicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), as bifenilas policloradas (PCBs) e os policlorinados dibenzofuranos (PCDF) (BUCHELI; FENT, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ROCHER *et al.*, 2006). Gubbins *et al.* (2000), também sugerem a indução deste mecanismo quando exposto à saxitoxinas.

A enzima Glutathione S-transferase (GST) é essencial no mecanismo de biotransformação de fase II realizando a conjugação com a participação de GSH (Glutathione reduzida) de compostos lipofílicos em hidrofílicos, desta maneira, facilitando a eliminação pela célula (KIM *et al.*, 2010; MARIONNET; DESCHAUX; REYNAUD, 2006).

O metabolismo em condições normais ou quando o organismo está

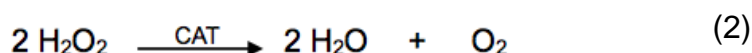
exposto a algum estresse produz agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre estas moléculas estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e o radical hidroxil (HO). Os biomarcadores envolvidos neste metabolismo fazem o balanço da produção e degradação das EROS para evitar que ocorra o estresse oxidativo causando o dano em moléculas como o DNA. Alguns destes biomarcadores são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e o composto não enzimático glutathiona reduzida (GSH).

A SOD é uma metaloenzima que atua na degradação do $\text{O}_2^{\bullet -}$, através da reação de dismutação. A partir desta reação é formado o H_2O_2 e oxigênio (O_2).



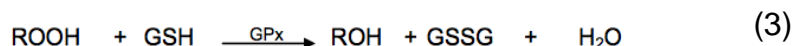
Reação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) (PEREIRA, 2014)

Com a formação do H_2O_2 pela ação da SOD é então necessária a ação das enzimas CAT e GPx que atuam na degradação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A CAT está presente nos peroxissomos da maioria das células (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



Reação da atividade da catalase (CAT) (PEREIRA, 2014)

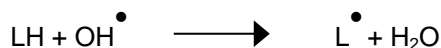
Diferente da CAT, a GPx degrada outros tipos de peróxidos, além do H_2O_2 . Essa é uma enzima selênio-dependente e a principal peroxidase nos peixes, sendo importante na degradação de peróxidos lipídicos, evitando as reações envolvidas na liperoxidação lipídica. O cofator para a sua atividade é a GSH (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



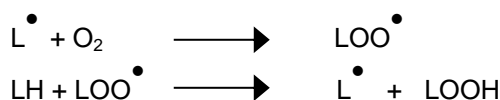
Reação da atividade da Glutathiona reduzida (GPx) (PEREIRA, 2014).

A GSH é um composto não enzimático, cofactor da atividade da GPx e também participa em reações no metabolismo de fase II, através da atividade da GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Alterações nos níveis de GSH estão relacionadas a mecanismos de detoxicação de xenobióticos pelos organismos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A lipoperoxidação (LPO) é um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo. Este dano ocorre nos fosfolipídios das membranas celulares, que são regiões muito suscetíveis a reações de oxidação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Quando as EROs reagem com os lipídios de membrana, afetam a função das membranas celulares, causando o aumento da permeabilidade, podendo chegar a ruptura total seguida de morte celular (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; MEAGHER; FITZGERALD, 2000).



Iniciação: Sequestro de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular



Propagação: o L^\bullet reage com o O_2 resultando em LLO^\bullet . Este novamente sequestra hidrogênio do ácido poliinsaturado, gerando o segundo L^\bullet



Terminação: autodestruição de radicais formados na etapa de programação

Reações do processo de lipoperoxidação (LPO) (BATISTA *et al.*, 2007).

A carbonilação de proteínas (PCO) também é um dano em moléculas causado pelo estresse oxidativo. O dano consiste na modificação de proteínas para grupamentos cetona e aldeído, além da perda da função de algumas enzimas como a piruvato desidrogenase (LEVINE *et al.*, 1994).

2.7.2 Biomarcadores genéticos

Componentes tóxicos podem também causar danos genéticos, como quebras na molécula do DNA, resultando em consequências biológicas nos organismos, na população e na comunidade. Marcadores genéticos são aqueles que detectam danos no DNA, sendo que alguns dos métodos utilizados para identificar tais danos é o teste do micronúcleo e a análise de alterações morfológicas. (LEE; STEINERT, 2003; HEDDLE, 1973; SCHIMD, 1975).

2.7.2.1 Micronúcleo Píscio e Alterações Morfológicas Nucleares

O teste do micronúcleo píscio foi proposto por Heddle (1973) e Schmid (1975) e avalia o dano no DNA através de análises quantitativas e qualitativas do corpúsculo de Howell-Jolly. Estes corpúsculos ou micronúcleos são fragmentos ou cromossomos inteiros que se individualizaram do núcleo da célula durante a divisão celular (FIGURA 5). Dessa forma este teste apenas pode ser realizado em células com capacidade de divisão.

As alterações morfológicas nucleares podem ser utilizadas como indicadores de efeitos genotóxicos, sendo estas incluídas na contagem de micronúcleos. Estas alterações podem ser classificadas como blebbed, lobed, vacuolated e notched (FIGURA 5) (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

As alterações do tipo blebbed, são núcleos com uma pequena evaginação na membrana nuclear. Elas são semelhantes ao micronúcleo, porém ainda estão ligadas ao núcleo. O núcleo lobed apresenta evaginações mais largas que as do blebbed.

Alterações do tipo vacuolated são núcleos que apresentam vacúolos em seu interior e as alterações do tipo notched são núcleos que apresentam um corte visível na sua membrana. A utilização das análises destas alterações tornam os resultados mais confiáveis e completos (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

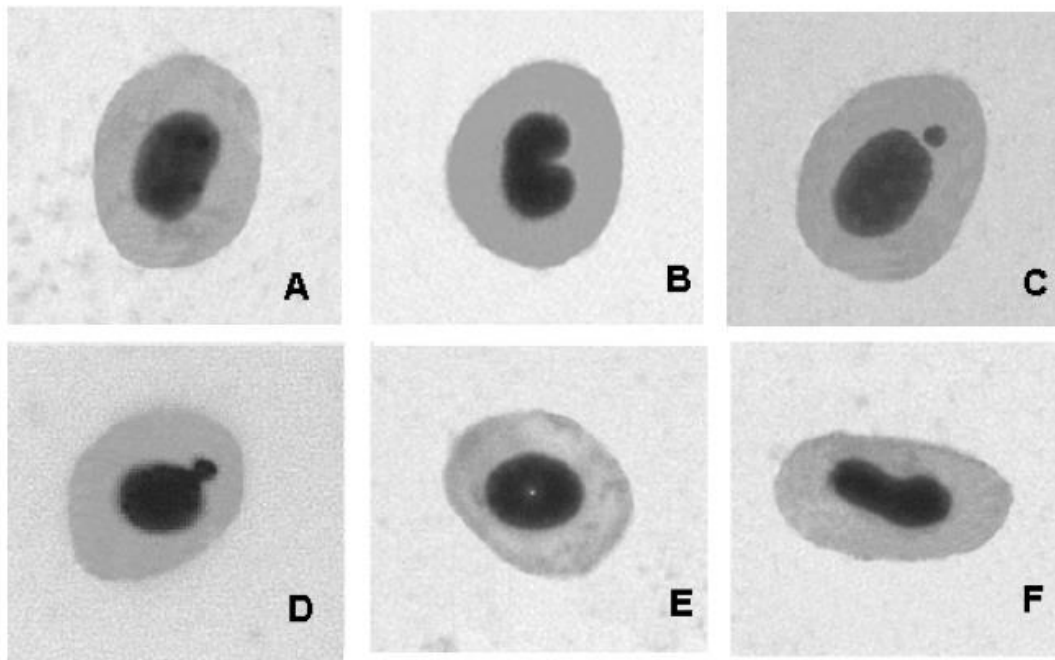


FIGURA 5: Alterações Morfológicas Nucleares. **A:** Núcleo normal; **B e F:** Notched; **C:** Micronúcleo; **D:** Blebbed e **E:** Vacuolated (SANTOS, 2010).

A preocupação da contaminação dos corpos d' água pelas cianotoxinas vem crescendo, sendo necessário o uso de ferramentas para identificar os reais danos que elas causam no ecossistema. O uso de diferentes análises biológicas, como as análises de biomarcadores, é fundamental para entender os efeitos destas toxinas. Desta maneira a integração destas diferentes ferramentas é importante em programas de monitoramento ambiental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a qualidade da água do reservatório Alagados, Paraná – Brasil, através da análise de cianobactérias e cianotoxinas, além de análises de biomarcadores na espécie de peixe *Geophagus brasiliensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a concentração de cianotoxinas na água e no músculo do peixe *Geophagus brasiliensis* do reservatório Alagados;
- Avaliar a saúde do peixe *Geophagus brasiliensis* do reservatório Alagados através das análises de biomarcadores bioquímicos e genéticos;
- Avaliar a possibilidade de depuração da cianotoxina;
- Produzir informação para ajudar na conservação e monitoramento da qualidade da água para os organismos aquáticos, assim como para a população humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de Dados

Quatro coletas de água foram realizadas no reservatório Alagados no inverno (setembro), primavera (novembro), verão (março) e outono (maio), entre 2014 e 2015. Em cada coleta de água foram amostrados 3 pontos do reservatório, sendo o ponto 1 o mais próximo da captação de água (FIGURA 6). Em todas as coletas de água foram medidos o pH, temperatura e o oxigênio dissolvido. Nas amostras de água foram realizadas análises qualitativas e quantitativas do fitoplâncton e análises químicas de quantificação de cianotoxinas.

Duas coletas de peixes (*Geophagus brasiliensis*) também foram realizadas com a finalidade de obter dados no período seco (novembro) e chuvoso (março) do ano. Em cada coleta de peixes foram amostrados 2 pontos do reservatório, correspondendo ao ponto 1 e ao ponto 3 das amostragem de água. Em média 30 peixes adultos foram coletados em cada ponto. Destes peixes, 15 foram anestesiados com benzocaína 0.0001% e o sangue foi colhido para as análises genéticas. Os peixes foram eutanasiados por secção medular, pesados, medidos e o fígado, cérebro e músculo coletados, no mesmo dia e no local. Esses organismos foram considerados como “grupo local” (P1 SECA, P2 SECA, P1 CHUVOSA e P2 CHUVOSA). Os tecidos foram armazenados em freezer -80°C para a realização das análises químicas, bioquímicas e genéticas. O restante dos animais (n=15) de cada ponto, em ambas as estações, foi transportado até o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR onde foram submetidos ao experimento de depuração. Esses organismos foram considerados como “grupo depuração” (DEP P1 e DEP P2).

Para a coleta e transporte dos peixes foi concedida uma permissão para tais atividades pelo SisBio (Sistema de autorização e informação em biodiversidade) pela solicitação número 39705 e para os experimentos laboratoriais (depuração) foram aprovados pelo comitê de ética CEUA/UFPR sob o certificado numero 715.

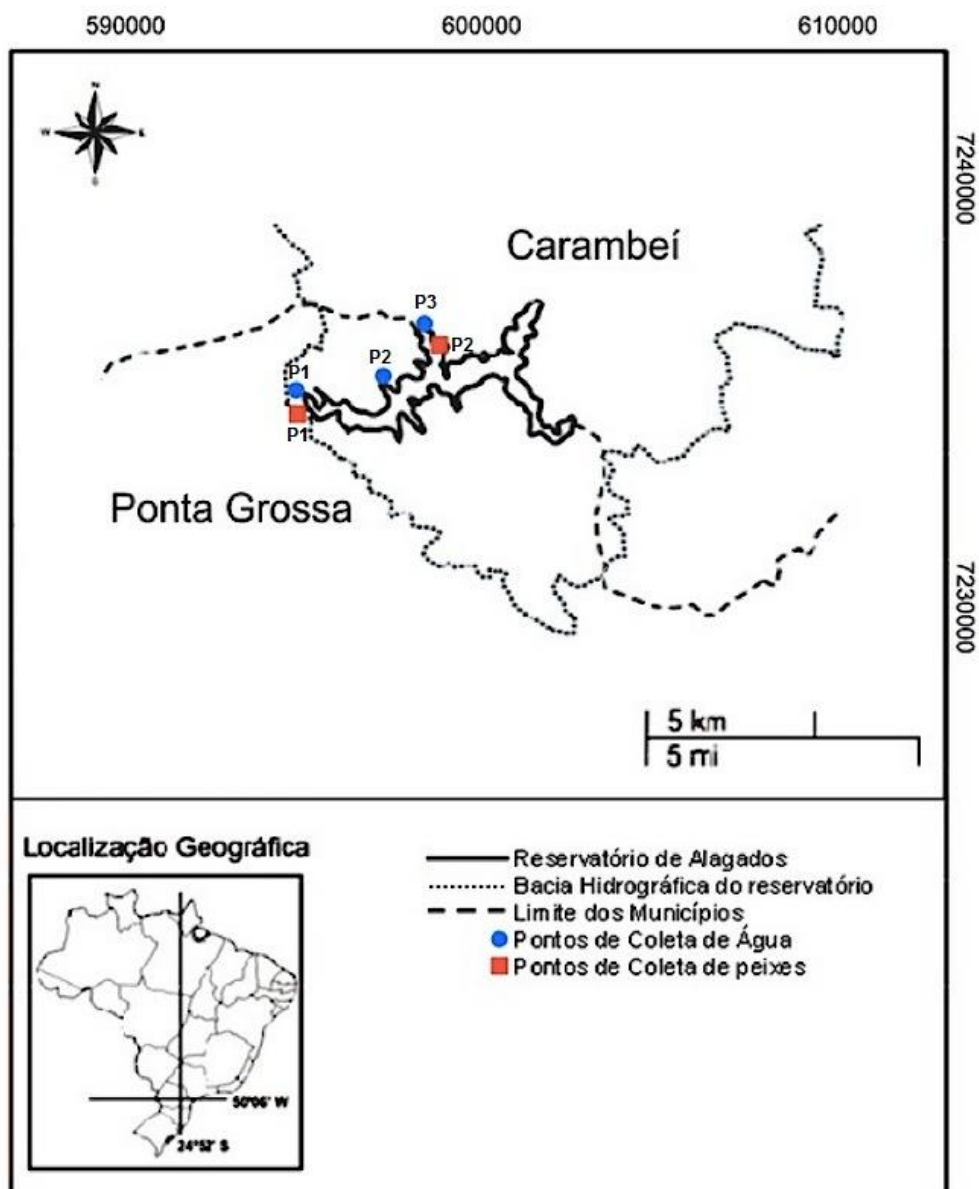


FIGURA 6: Mapa do Reservatório Alagados e pontos de coleta de água e peixes da espécie *Geophagus brasiliensis* (Modificado de WOJCIECHOWSKI, 2013).

4.2 Fator de Condição (K)

O fator de condição (K) foi utilizado como um indicador de estresse ambiental, indicando o grau de bem estar do organismo frente ao ambiente em que vive (BOLGER; CONNOLY, 1989). Ele foi calculado a partir do peso total

do animal em relação ao comprimento total elevado à terceira potência. O resultado foi multiplicado por 100 como apresentado na equação abaixo:

$$K = \frac{\text{peso do animal}}{(\text{comprimento do animal})^3} * 100 \quad (5)$$

4.3 Índice Hepatosomático

O índice hepatossomático (IHS) foi utilizado como indicador de estresse ambiental. Ele foi calculado a partir do peso do fígado do animal em relação ao peso total. O resultado foi multiplicado por 100 como apresentado na equação abaixo:

$$IHS = \frac{\text{peso do fígado do animal}}{\text{peso total do animal}} * 100 \quad (6)$$

4.4 Experimentos Laboratoriais

4.4.1 Experimentos de depuração

O experimento de depuração foi realizado com a finalidade de avaliar a possibilidade de depuração das cianotoxinas. Os peixes coletados foram mantidos em aquários com água filtrada, na densidade de aproximadamente 1 g/L (1 grama de peixe/litro de água), em sala aclimatizada a 25°C, fotoperíodo de 12 horas e alimentados com anelídeos. Os aquários foram mantidos com sistema de aeração e 1/3 da água foi trocada de 48 em 48 horas.

Após o período de 40 dias esses animais foram anestesiados com benzocaína 0.0001% e o sangue coletado para as análises genéticas. Os peixes foram eutanasiados por secção medular, pesados e medidos. A coleta do fígado, cérebro e músculo desses indivíduos também foi realizada. Os tecidos foram armazenados em freezer -80°C para a realização das análises químicas, biomarcadores bioquímicos e genéticos.

4.4.2 Análises Quantitativas e Qualitativas do Fitoplâncton

As amostras de água destinadas à análise qualitativa do fitoplâncton foram coletadas com rede de plâncton (20 µm de abertura de malha) através de arrasto vertical. As amostras resultantes foram divididas em duas alíquotas, sendo que uma foi preservada em solução de Transeau, adicionando-se igual volume de fixador ao volume da amostra, e outra levada fresca (viva) ao laboratório e observadas em microscópio óptico no mesmo dia da coleta. As microalgas foram identificadas com auxílio de bibliografia específica. As amostras destinadas a análise quantitativa do fitoplâncton foram coletadas com garrafa de Van Dorn e fixadas com lugol acético. A determinação da abundância (céls.mL) dos grupos e espécies do fitoplâncton foi obtida através de contagem em microscópio invertido Olympus IX70, sedimentando um volume 10 mL em câmaras de sedimentação de acordo com a técnica de Ütermohl (1958). Um total de 400 células foi contado em campos aleatórios de acordo com Chorus e Bartram (1999), reduzindo o erro de contagem para 10% (VENRICK, 1978).

4.4.3 Análises Químicas

Para a análise de concentração de cianotoxinas foi realizado o método de Oshima (1995) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. O equipamento foi calibrado com os padrões de saxitoxina (saxitoxina e neosaxitoxina) e goniatoxinas (GTX1, GTX2, GTX3 e GTX4). Os limites de detecção dos padrões foram: STX 5,90 ng/mL; neoSTX 6,14 ng/mL; GTX1 124,20 ng/mL; GTX2 9,03 ng/mL; GTX3 3,42 ng/mL e GTX4 40,52 ng/mL. Todos os padrões assim como as amostras foram analisados em triplicatas.

As concentrações detectadas foram convertidas para equivalente de saxitoxina (equiv. STX). A concentração de equiv. STX foi determinada a partir da equação:

$$\text{Equiv. STX} = \sum C_i \times T_i$$

C_i = Concentração da toxina

T_i = Toxicidade relativa da toxina

Os valores da toxicidade relativa de cada toxina foi determinada utilizando as toxinas purificadas em bioensaio com camundongos (TABELA 1) (HALL *et al.*, 1990).

TABELA 1: TOXICIDADE RELATIVA DAS PSTs ANALISADAS

PSTs	TOXICIDADE RELATIVA (T_i)
STX	1
GTX1	0,9940
neoSTX	0,9243
GTX4	0,7261
GTX3	0,6379
GTX2	0,3592

(HALL *et al.*, 1990; OSHIMA, 1995)

4.4.3.1 Água

As amostras foram congeladas em freezer - 20°C e após foram liofilizadas. O liofilizado foi ressuspendido em 5 mL de ácido acético 0,5 N. As amostras foram agitadas e filtradas em filtro de celulose 0,45 µm. Em seguida as amostras foram encaminhadas para a análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (OSHIMA, 1995).

4.4.3.2 Músculo

Para a extração das cianotoxinas 5 gramas de tecido úmido foi coletado de cada organismo. Ao tecido foi adicionado 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N e centrifugado à 15.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o

sobrenadante foi separado e a extração foi repetida, juntando no final o sobrenadante das duas extrações. Ao final as amostras foram filtradas em filtro de celulose 0,45 µm e encaminhadas para a análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (OSHIMA, 1995).

4.5 Biomarcadores Bioquímicos

As amostras de fígado foram homogeneizadas na proporção 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1 pH 7,0, com auxílio de micro-homogeneizador. Para as amostras de cérebro e músculo foi utilizado o tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 para a homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 4°C a 15.000 x g para as amostras de fígado e a 12.000 x g para as amostras de cérebro e músculo. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas que foram armazenadas em freezer -80°C, para posteriormente medir a atividade das enzimas e a concentração de proteína.

4.5.1 Concentração proteica

Para a normalidade dos dados nas diferentes análises bioquímicas foi realizado o teste de Bradford (1976), para a quantificação de proteínas totais. Os homogenatos de todos os tecidos foram diluídos em uma proporção de 1:20. Após a diluição 10 µL da amostra diluída foi pipetada em microplaca e adicionado 250 µL da solução de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de uma curva padrão realizada com albumina de soro bovino (BSA). A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm.

4.5.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

O homogenato das amostras de cérebro e músculo foram diluídos para obter uma concentração de 1 mg/mL de proteína. Uma alíquota de 50 µL da

amostra diluída, 200 μ L da solução de DTNB e 50 μ L da solução de acetilcolina foram pipetadas em microplaca. A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 415 nm. O método foi baseado em Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998).

4.5.3 Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

O princípio do método para determinar a atividade da EROD foi baseado na detecção fluorimétrica da resorufina, depois de uma reação de oxigênio-desetilação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 482 nm. Este método foi baseado em Burke e Mayer (1974). Na microplaca foi pipetado 50 μ L da amostra de fígado e 200 μ L de 7-etóxi. Após a incubação de 5 minutos foi adicionado 10 μ L de NADPH e incubado por mais 5 minutos. A análise foi realizada por 10 minutos.

4.5.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

O método para determinar a atividade da enzima GST foi baseado em Keen, Habig e Jakoy (1976). A GST catalisa a reação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído para obter uma concentração de 2 mg/mL de proteína. Na microplaca foi adicionado 20 μ L da amostra diluída e 180 μ L de meio de reação, em triplicata. A análise foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm.

4.5.5 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

O método analisa a capacidade da SOD de inibir a redução do NBT para azul formazan, devido o oxigênio gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído (1:10). Em 40 μ L da amostra diluída foi adicionado 885 μ L de tampão Tris-EDTA pH 8,0, 50 μ L de pirogalol e incubadas por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado

25 μL de HCl 1N e 300 μL da reação foi pipetada em microplaca. Para cada amostra foi feita uma amostra controle a qual não passou pelo processo de incubação. A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm (CROUCH; GANDY; KIMSEY, 1981).

4.5.6 Atividade da Catalase (CAT)

O método utilizado foi baseado em AEBI (1984), que consiste em medir a atividade da catalase através da degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído (1:5) e 5 μL da amostra diluída foi pipetado na microplaca junto com 295 μL de solução reação. A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm.

4.5.7 Atividade da Glutathione peroxidase (GPx)

O método para determinar a atividade da GPx baseou-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, gerado durante a redução de GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH (HAFEMAN; SUNDE; HOEKSTRA, 1974). As amostras de fígado foram diluídas em uma proporção de 1:2. Uma alíquota de 10 μL da amostra diluída, 130 μL de solução de azida sódica e 60 μL de solução de peróxido de hidrogênio foram pipetadas em microplaca e a análise foi realizada após dois minutos.

4.5.8 Concentração de Glutathione reduzida (GSH)

O método para indicar a concentração da glutathione reduzida foi baseado em Sedlak e Lindsay (1968). Uma alíquota de 200 μL de amostra de fígado pura com 50 μL de TCA (ácido tricloroacético) 50% foi utilizada e centrifugada à 10000x g por 10 minutos. Na microplaca foi pipetado 50 μL do sobrenadante, 230 μL de tampão TRIS 0,4 M e 20 μL de DTNB 2,5 mM. A análise foi realizada no comprimento de onda de 415 nm.

4.5.9 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação de lipídios foi analisada através do método FOX, que baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxido sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} – laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve a luz a 550-570 nm. O homogenato puro das amostras de fígado foi ressuspenso em metanol (1:1) e centrifugado à 5000 g por 5 minutos. Após, foi adicionado o reativo Fox à 100 μL do sobrenadante e incubadas por 30 minutos. Em microplaca foi pipetado 300 μL da reação, em triplicata. A análise em espectrofotometria foi realizada em comprimento de onda de 560 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

4.5.10 Carbonilação de proteínas (PCO)

A 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com proteínas carboniladas, formando dinitrofenil hidrazonas que podem ser detectadas a um comprimento de onda de 358-370 nm (LEVINE *et al.*, 1994). Para este ensaio foi utilizado 200 μL de amostra pura de fígado, dividida em duas alíquotas, uma para o teste e outra para o branco. A cada alíquota de 100 μL do teste foi adicionado 250 μL de DNPH a 10 mM e a cada alíquota de 100 μL do branco foi adicionado 250 μL de HCL a 2,0 M. As amostras permaneceram durante 90 minutos em banho-maria à 30-37°C e logo em seguida foram colocadas no gelo. Para ambas as amostras, teste e branco, foram adicionados 350 μL de TCA a 28%. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 9000 x g e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 500 μL de etanol-acetato de etila (1:1), centrifugado por 10 minutos à 9000 x g e o sobrenadante foi descartado. Os dois procedimentos anteriores foram repetidos 2 vezes. Ao pellet foi adicionado 500 μL de cloreto de guanidina a 6,0 M, centrifugado por 3 minutos à 3000 x g e o sobrenadante foi pipetado em microplaca.

4.6 Biomarcadores Genéticos

4.6.1 Micronúcleo Píscio e Alterações Morfológicas Nucleares

A fim de verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975) para a montagem de lâminas. Um esfregaço foi feito com o sangue de cada peixe em lâmina de vidro limpa, fixado com etanol por 30 minutos e corado com laranja de acridina. Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe em aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência. Além dos micronúcleos, foram também contabilizadas as alterações morfológicas nucleares de acordo com Carrasco, Tilbury e Myers (1990) e a frequência de eritrócitos policromáticos, segundo Ueda *et al.* (1992) e Cavas, Garanko e Arkhipchuk (2005).

4.7 Análises Estatísticas

Os resultados das análises químicas, fator de condição (K), índice hepatossomático (IHS) e biomarcadores foram expressos como média e erro padrão da média para os dados normais e mediana para os dados não normais. A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Levene. A análise utilizada para dados que apresentaram distribuição normal foi o teste t pareado para amostras independentes, quando os dados não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney *U*-test. Estes testes foram aplicados afim de demonstrar as diferenças estatísticas entre os grupos. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism v 5.00. A regra de decisão foi de $p < 0,05$ para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da água

Os resultados de temperatura, pH e oxigênio dissolvido das quatro estações do período de setembro de 2013 à maio de 2014 estão representados na TABELA 2. Os resultados das análises quantitativas e qualitativas do fitoplâncton apresentaram diferenças ao longo do período do estudo. Foram evidenciadas a ocorrências de 18 espécies de cianobactérias no reservatório Alagados, sendo 8 delas potencialmente tóxicas. A cianobactéria dominante em todas as estações foi *Cylindrospermopsis raciborskii*, com maior densidade no verão (março), atingindo 1 milhão de células/mL no ponto 1. Outras cianobactérias potencialmente tóxicas que apresentaram elevada densidade no reservatório foram *Dolichospermum planctonicum* e *Aphanizomenon sp.* (TABELA 3, 4, 5, 6 e FIGURA 7).

Nas análises químicas de água foram detectadas a presença de STX, NeoSTX e goniautoxinas 1, 2 e 3 (TABELA 7).

TABELA 2: TEMPERATURA, PH E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO NOS TRÊS PONTOS DE COLETA

ESTAÇÕES DO ANO	PONTOS DE COLETA	TEMPERATURA (°C)	PH	OXIGÊNIO DISSOLVIDO (MG/L)
Inverno	1	18,0	7,1	5,78
	2	18,2	6,9	5,7
	3	19,0	7,2	6,04
Primavera	1	25,4	7,4	5,53
	2	25,4	7,09	5,51
	3	23,5	7,2	5,36
Verão	1	26,4	8,5	5,56
	2	27	8,1	5,65
	3	25	8,6	5,73
Outono	1	19,0	8,3	6,22
	2	19,2	7,8	6,32
	3	21	7,7	5,68

TABELA 3: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO INVERNO (SETEMBRO) 2013

ESPÉCIES	DENSIDADE (CÉLS/ML)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
<i>Arthrospira</i> sp.	0	0	10^3
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> *	10^4	$2,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
<i>Dolichospermum planctonicum</i> *	10^4	$1,5 \times 10^4$	9×10^3
<i>Leptolingbya tenuis</i>	0	$1,2 \times 10^4$	0
Cyanophyceae (NI)	10^3	6×10^3	0
<i>Rhabdoderma</i> sp.	2×10^2	5×10^2	0
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	9×10^3	0	0
<i>Synechococcus nidulans</i> *	6×10^3	10^2	0
TOTAL:	$3,8 \times 10^4$	6×10^4	$5,9 \times 10^4$

(NI) Cianobactéria não identificada

* cianobactérias potencialmente tóxicas

TABELA 4: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NA PRIMAVERA (NOVEMBRO) 2013

ESPÉCIES	DENSIDADE (CÉLS/ML)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
<i>Aphanizomenon</i> sp. *	$1,8 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$
<i>Arthrospira</i> sp.	10^3	0	0
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> *	$5,5 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
<i>Dolichospermum planctonicum</i> *	$2,8 \times 10^4$	0	0
<i>Geitlerinema amphibium</i> *	3×10^3	$1,5 \times 10^3$	0
Cyanophyceae (NI)	0	10^2	2×10^2
<i>Microcystis aeruginosa</i> *	4×10^3	$2,2 \times 10^3$	0
<i>Merismopedia tenuissima</i>	3×10^3	0	$1,2 \times 10^3$
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	0	0	$5,4 \times 10^3$
<i>Synechococcus nidulans</i> *	2×10^2	0	10^3
TOTAL:	$1,23 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$

(NI) Cianobactéria não identificada

* cianobactérias potencialmente tóxicas

TABELA 5: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DE FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO VERÃO (MARÇO) 2014

ESPÉCIES	DENSIDADE (CÉLS/ML)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
<i>Aphanizomenon</i> sp.*	$5,8 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> *	0	$2,7 \times 10^4$	0
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> *	10^6	$4,13 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$
<i>Dolichospermum planctonicum</i> *	$3,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
Cyanophyceae (NI)	3×10^3	4×10^2	6×10^2
<i>Merismopedia tenuissima</i>	$1,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$
<i>Oscillatoria</i> sp.*	$3,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
<i>Pseudanabaena galeata</i>	9×10^2	0	0
<i>Pseudoanabaena catenata</i>	$1,4 \times 10^3$	0	0
<i>Rhabdoderma</i> sp.	0	0	4×10^2
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	0	$2,5 \times 10^4$	0
<i>Spirulina</i> sp.	2×10^2	10^2	3×10^2
<i>Synechococcus nidulans</i> *	0	7×10^3	0
TOTAL:	$1,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$

(NI) Cianobactéria não identificada

* cianobactérias potencialmente tóxicas

TABELA 6: DENSIDADES DAS ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NO OUTONO (MAIO) 2014

ESPÉCIES	DENSIDADE (CÉLS/ML)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
<i>Aphanizomenon</i> sp.*	$3,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
<i>Aphanothece conglomerata</i>	$2,9 \times 10^3$	2×10^3	0
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> *	$3,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	2×10^4
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> *	$3,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$
<i>Arthrospira</i> sp.	10^2	0	0
<i>Dolichospermum planctonicum</i> *	$1,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$
<i>Geitlerinema amphibium</i> *	10^3	$1,1 \times 10^4$	0
Cyanophyceae (NI)	7×10^2	$2,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$
<i>Merismopedia tenuissima</i>	$1,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
<i>Oscillatoria</i> sp.*	10^3	4×10^3	0
<i>Pseudanabaena galeata</i>	0	0	7×10^2
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	7×10^3	$1,8 \times 10^4$	0
<i>Spirulina</i> sp.	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	4×10^2
TOTAL:	$4,62 \times 10^5$	$4,64 \times 10^5$	$3,07 \times 10^5$

(NI) Cianobactérias não identificada

* cianobactérias potencialmente tóxicas

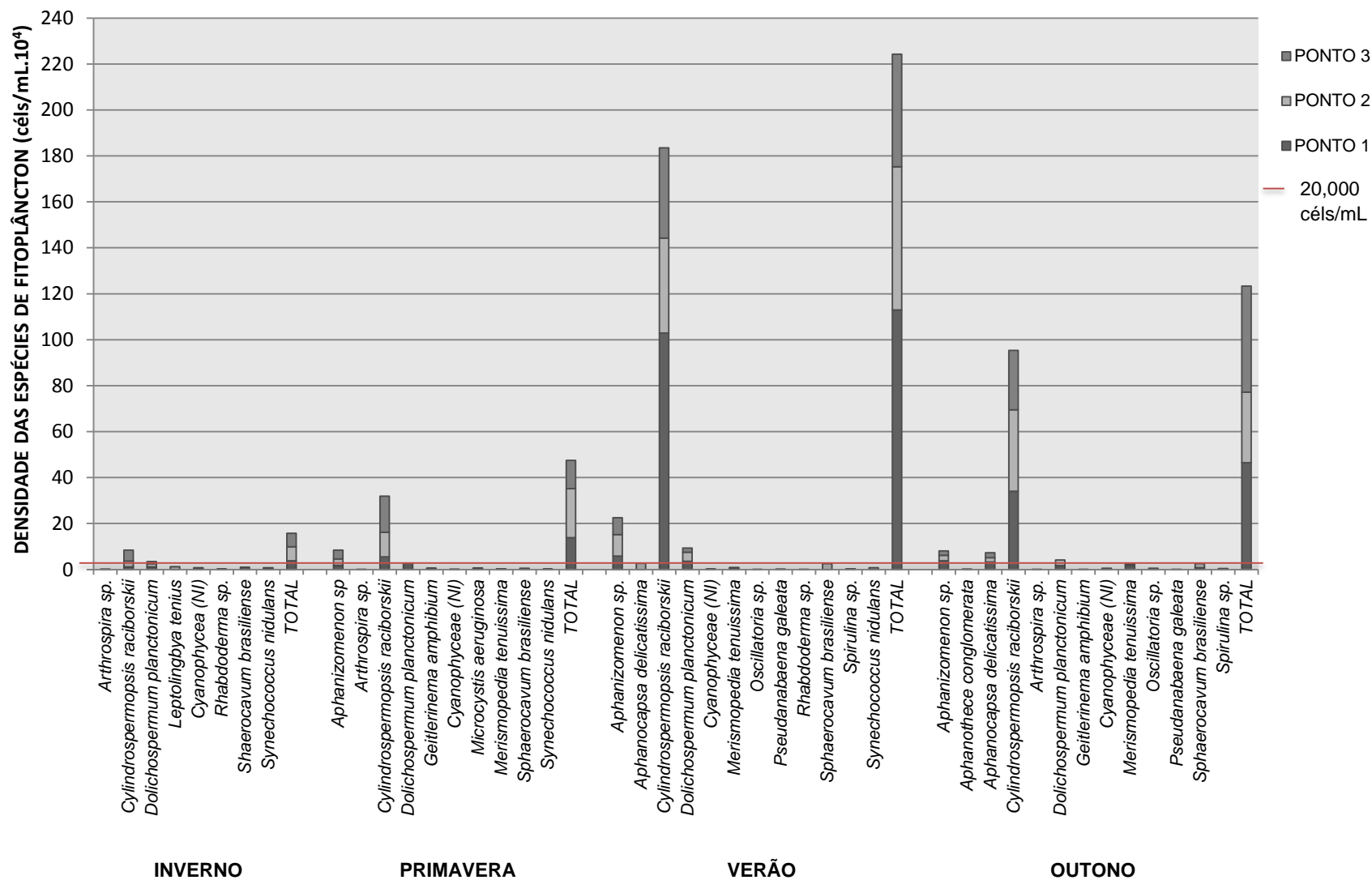


FIGURA 7: Densidade de espécies de fitoplâncton (célis/mL.10⁴) do reservatório Alagados no período de setembro de 2013 à maio de 2014.

TABELA 7: CONCENTRAÇÕES DE PSTS NA ÁGUA DO RESERVATÓRIO ALAGADOS NAS QUATRO ESTAÇÕES E NOS TRÊS PONTOS DE COLETA

ESTAÇÕES	PONTOS DE COLETA	STX/NEOSTX (µg/L)	GONIAUTOXINAS (µg/L)				CONCENTRAÇÃO DE PSTS TOTAIS (µg/L)	Equiv. STX (µg/L)
			GTX1	GTX2	GTX3	GTX4		
Inverno	1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	2	<LD	7,466	<LD	<LD	<LD	7,466	7,42
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
Primavera	1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-	-
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	3	0,365	<LD	0,050	<LD	<LD	0,415	0,35
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
Verão	1	5,337	<LD	12,061	6,815	<LD	24,213	13,18
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	2	0,975	<LD	10,321	4,670	<LD	15,966	7,03
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	3	1,011	<LD	1,943	1,253	<LD	4,207	2,30
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
Outono	1	1,313	<LD	2,413	2,939	<LD	6,665	3,62
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	2	1,441	<LD	2,362	2,093	<LD	5,896	3,30
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
	3	1,107	<LD	1,974	1,673	<LD	4,754	2,62
		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		

<LD: Abaixo do limite de detecção

<LQ: Abaixo do limite de quantificação

5.2 Análise de PSTs no músculo dos peixes *Geophagus brasiliensis*

Traços de saxitoxina (concentrações <LQ) e concentrações de goniautoxinas foram detectadas no músculo dos peixes de todos os grupos, “grupos local” (P1 SECA; P2 SECA; P1 CHUVOSA; P2 CHUVOSA) e “grupos depuração” (DEP 1; DEP 2). Em ambas as estações, a porcentagem de peixes com presença de saxitoxina no músculo diminuiu nos “grupos depuração” em relação aos “grupos local” e para GTX 2 a porcentagem de peixes com a presença da toxina aumentou nos “grupos depuração”. Esses resultados não foram evidenciados apenas para o “grupo depuração” ponto 2 da estação chuvosa (FIGURA 8). As concentrações de GTX 2 nos grupos depuração foram maiores que seus grupos local, exceto para a depuração do ponto 2 da estação seca (Mann-Whitney *U*-test, $p = 0,0079$; $p = 0,05$; $p = 0,051$). Não foram encontradas diferenças no acúmulo de toxinas pelos peixes entre as estações (TABELA 8).

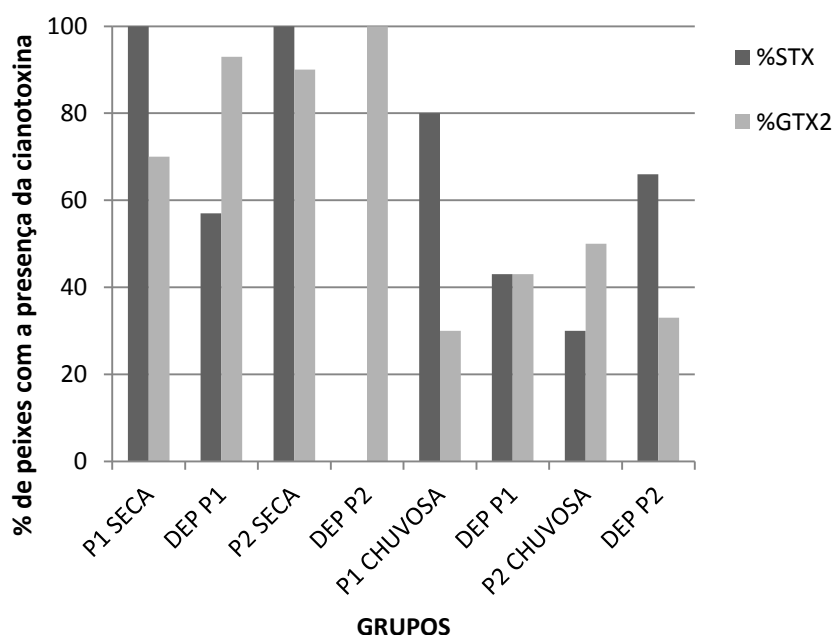


FIGURA 8: Porcentagem (%) de organismos com a presença de PSTs em cada grupo.

TABELA 8: CONCENTRAÇÕES DE STX, GONIAUTOXINAS (1, 2, 3 E 4) E PSTS NO MÚSCULO DOS PEIXE

GRUPOS	STX ($\mu\text{g}/100\text{kg}$)	GTX ($\mu\text{g}/100\text{kg}$)	Concentração total de PSTs ($\mu\text{g}/100\text{kg}$)	Equiv. STX ($\mu\text{g}/100\text{kg}$)
		GTX 2		
P1 SECA	<LQ	$5,44 \pm 1,30$	5,44	1,95
P2 SECA	<LQ	$13,40 \pm 10,94$	13,40	4,81
DEP P1	<LQ	$14,35 \pm 10,24$	14,35	5,15
DEP P2	<LD	$15,07 \pm 6,55$	15,07	5,41
P1 CHUVOSA	<LQ	$8,09 \pm 4,53$	8,09	2,90
P2 CHUVOSA	<LQ	$7,40 \pm 2,66$	7,40	2,66
DEP P1	<LQ	$86,02 \pm 56,36$	86,02	30,90
DEP P2	<LQ	$62,51 \pm 39,70$	62,51	22,45

<LQ: Abaixo do limite de quantificação

<LD: Abaixo do limite de detecção

5.3 Fator de condição (K) e índice hepatossomático (IHS)

O fator de condição (K), assim como o índice hepatossomático (IHS), foram menores na estação chuvosa, a qual apresentou a maior concentração de toxinas (t-test=2, df=8, p=0,0216; t-test=2,368, df=9, p=0,0421; t-test=4,313, df=8, p=0,0026; t-test=3,238, df=9, p=0,0102) (FIGURA 9).

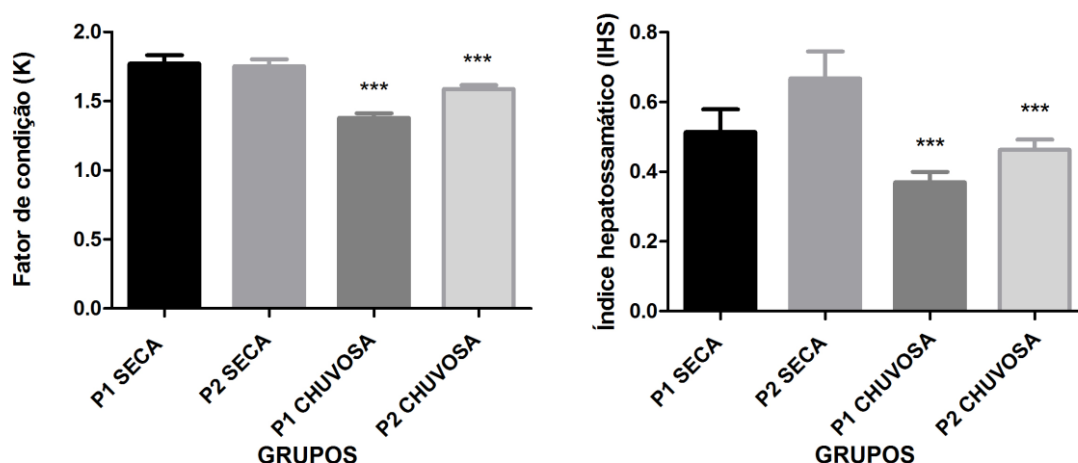


FIGURA 9: Fator de condição **A** e índice hepatossomático **B** em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney U-test (p<0,05). *** Diferença estatística entre os pontos de coleta (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

5.4 Biomarcadores bioquímicos

5.4.1 Neurotoxicidade

A atividade da acetilcolinesterase cerebral apresentou menor atividade no ponto 2 em ambas as estações (t-test=3,635, df=8, $p=0,0066$; Mann-Whitney U -test, $p=0,01$). Nos “grupos depuração” observamos o aumento da atividade da enzima, exceto para o “grupo depuração” da estação chuvosa ponto 1 (t-test=2,767, df=8, $p=0,0244$; Mann-Whitney U -test, $p=0,0364$; $p<0,0001$) (FIGURA 10).

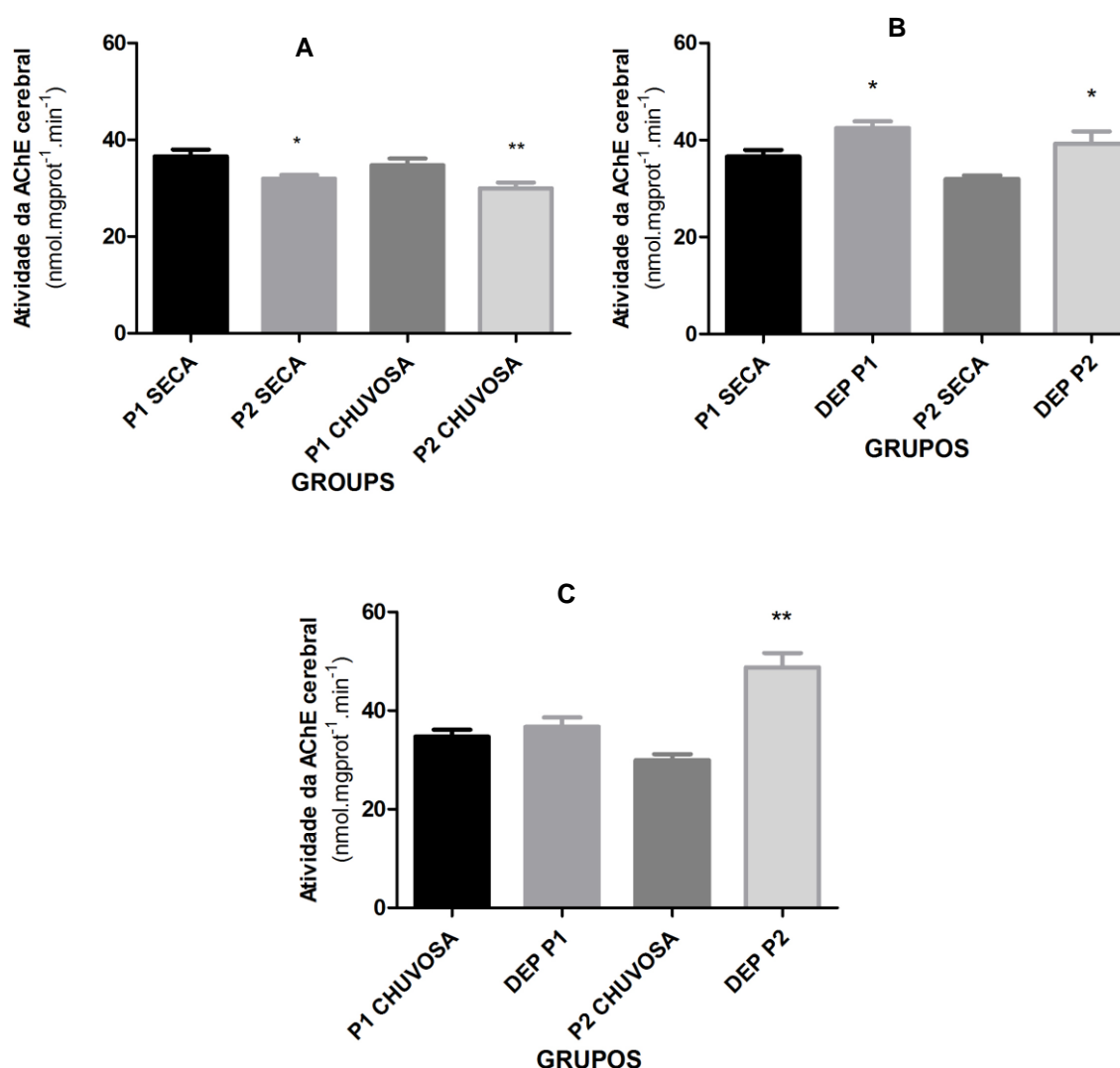


FIGURA 10: Atividade da Acetilcolinesterase cerebral **A**, **B** e **C** em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney U -test ($p<0,05$). * Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa.

Para os resultados da acetilcolinesterase muscular, a atividade da enzima foi menor na estação seca em relação a estação chuvosa (t -test=8,531, df =8, p =<0,0001; t -test=3,446, df =9, p =0,0073). Foi observada a diminuição da atividade no ponto 2, exceto para a estação seca onde a diminuição ocorreu no ponto 1 (Mann-Whitney U -test, p =0,0001; t -test=2,967, df =8, p =0,0180). Os “grupos depuração” também apresentaram aumento da atividade da enzima, exceto para a depuração ponto 2 da estação seca (t -test=3,964, df =8, p =0,0042; t -test=4,711, df =14, p =0,0003; t -test=3,594, df =14, p =0,0029 (FIGURA 11).

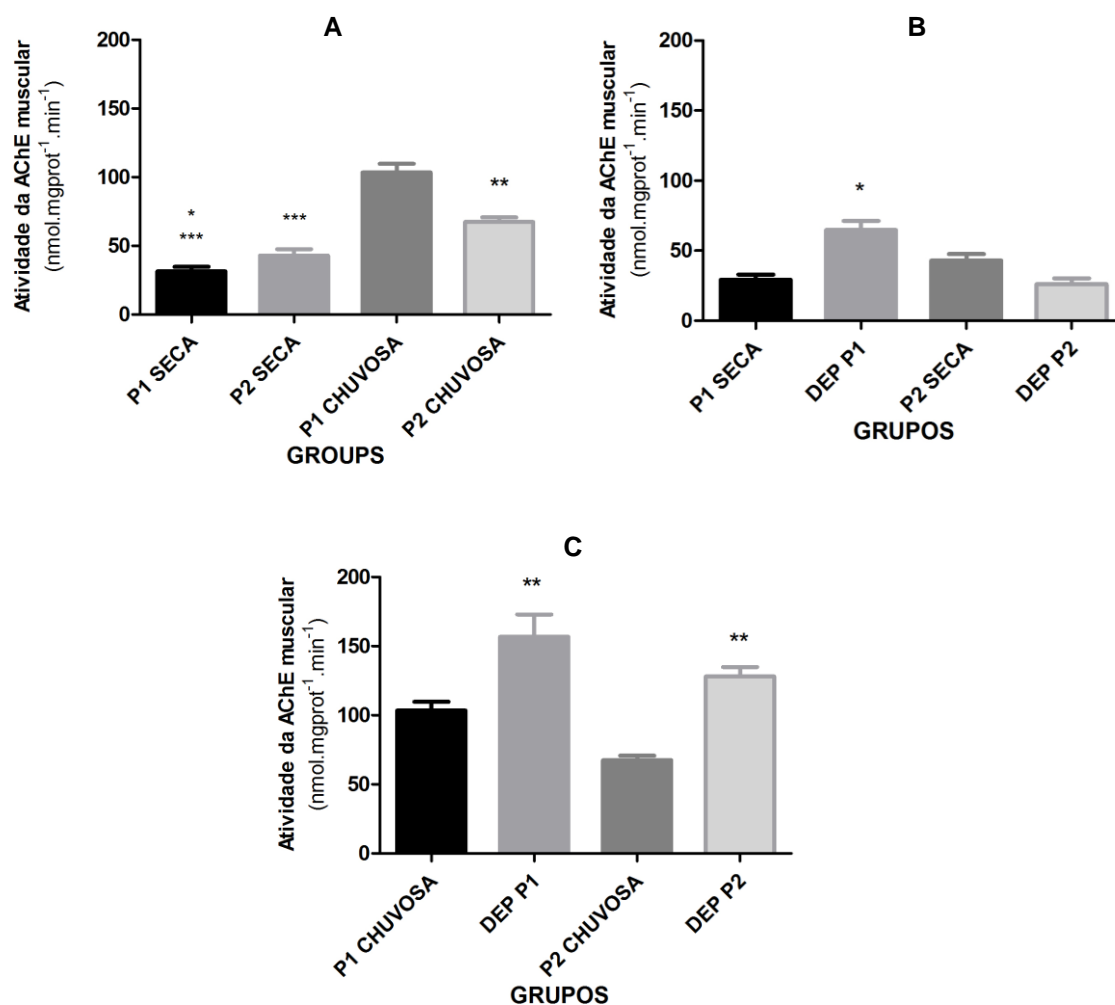


FIGURA 11: Atividade da Acetilcolinesterase muscular **A**, **B** e **C** em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney U -test (p <0,05). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa. ***Diferença estatística entre os pontos (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

5.4.2 Biotransformação/estresse oxidativo

A atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) foi maior na estação chuvosa em relação a estação seca no ponto 2 (t -tes=5,800, df =8, p =0,0004). Na estação chuvosa, o ponto 1 e o ponto 2 apresentaram diferença estatística quanto a concentração de toxinas, além do ponto 1 apresentar atividade maior que o “grupo depuração” (t -test=2,410, df =12, p =0,0329; t -test=3,275, df =4, p =0,0306) (FIGURA 12).

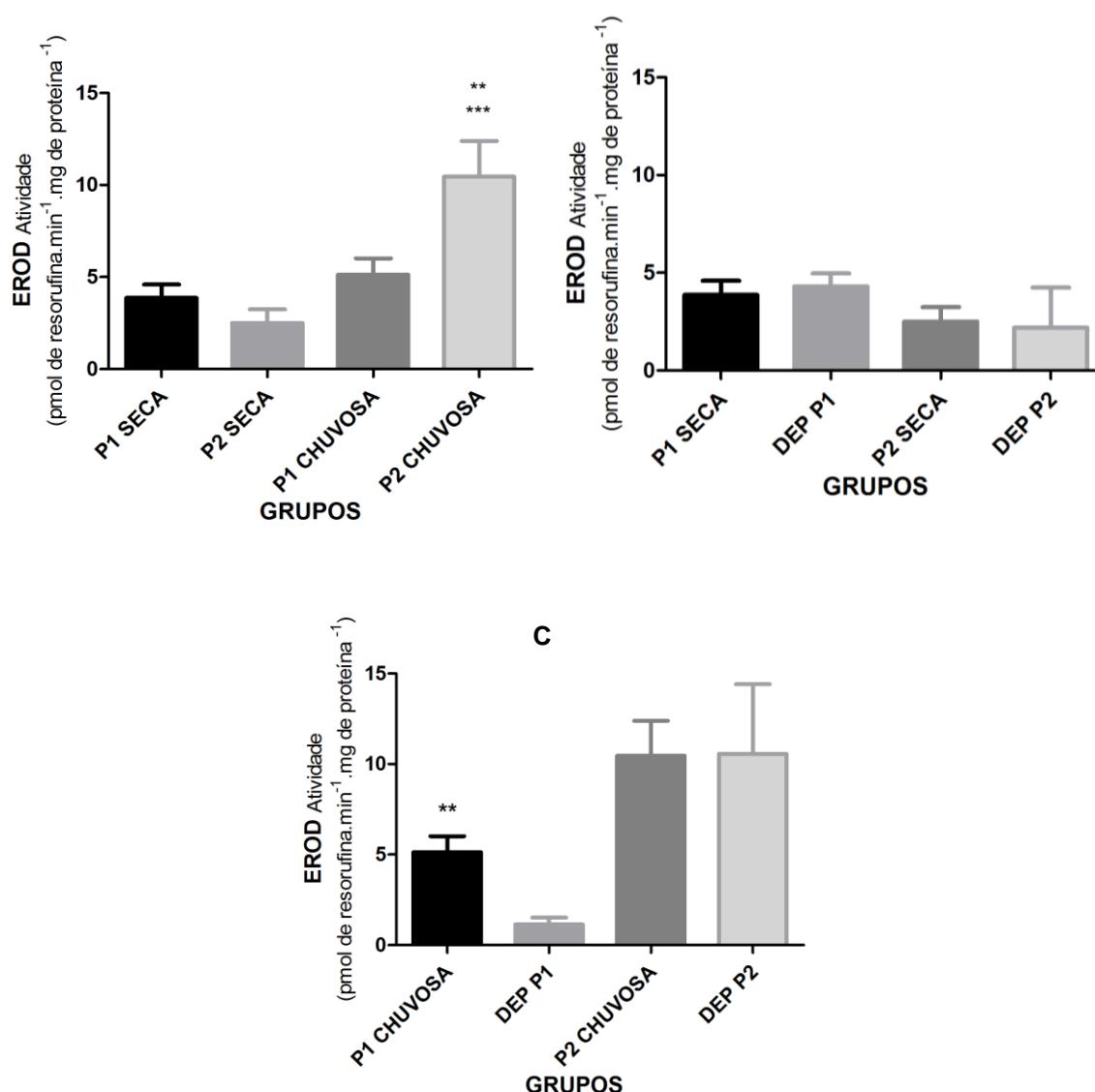


FIGURA 12: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Etoxiresorufina- O-deetilase (EROD) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney U -test (p <0,05). ** Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa. ***Diferença estatística entre os pontos correspondentes (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

A atividade da glutathiona S-transferase foi maior nos organismos da estação seca em relação a estação chuvosa ponto 1 (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0071$). Já na estação chuvosa houve diferença entre o ponto 1 e o ponto 2 (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0424$). Todos os “grupos local” apresentaram maior atividade que os “grupos depuração” em ambas as estações (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0048$; $p=0,0490$; $p=0,0350$; $p=0,0015$) (FIGURA 13).

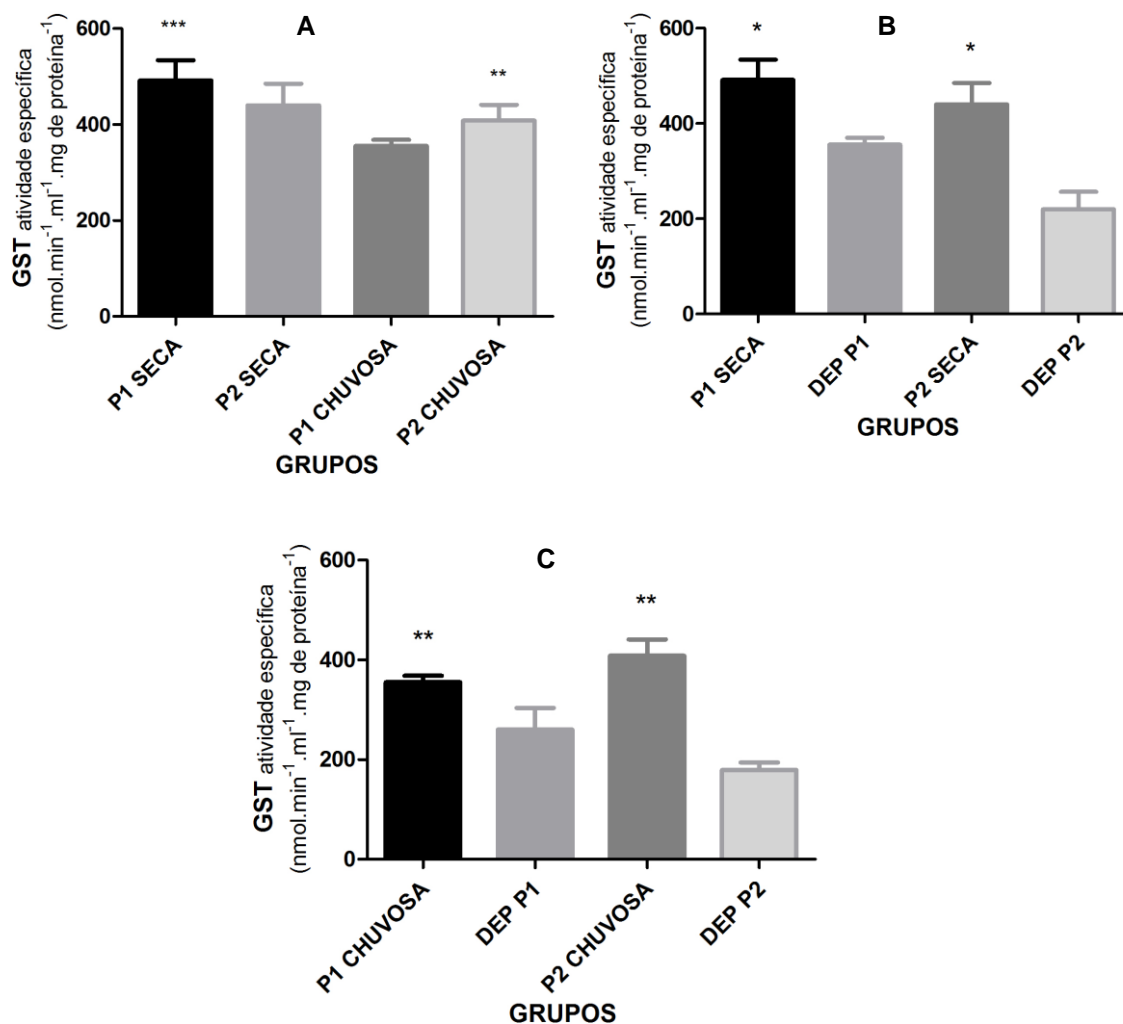


FIGURA 13: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Glutathiona S-transferase (GST) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney *U*-test ($p<0,05$). * Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa. ***Diferença estatística entre os pontos (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior nos organismos da estação seca ponto 1 em relação aos da estação seca ponto 2 (t-test=3,213; df=8, p=0,0124). Os “grupos depuração” apresentaram maior atividade que os “grupos local”, exceto a depuração ponto 1 da estação seca (Mann-Whitney *U*-test, p=0,018; t-test=3,017, df=10, p=0,0130; Mann-Whitney *U*-test p=0,0330). (FIGURA 14).

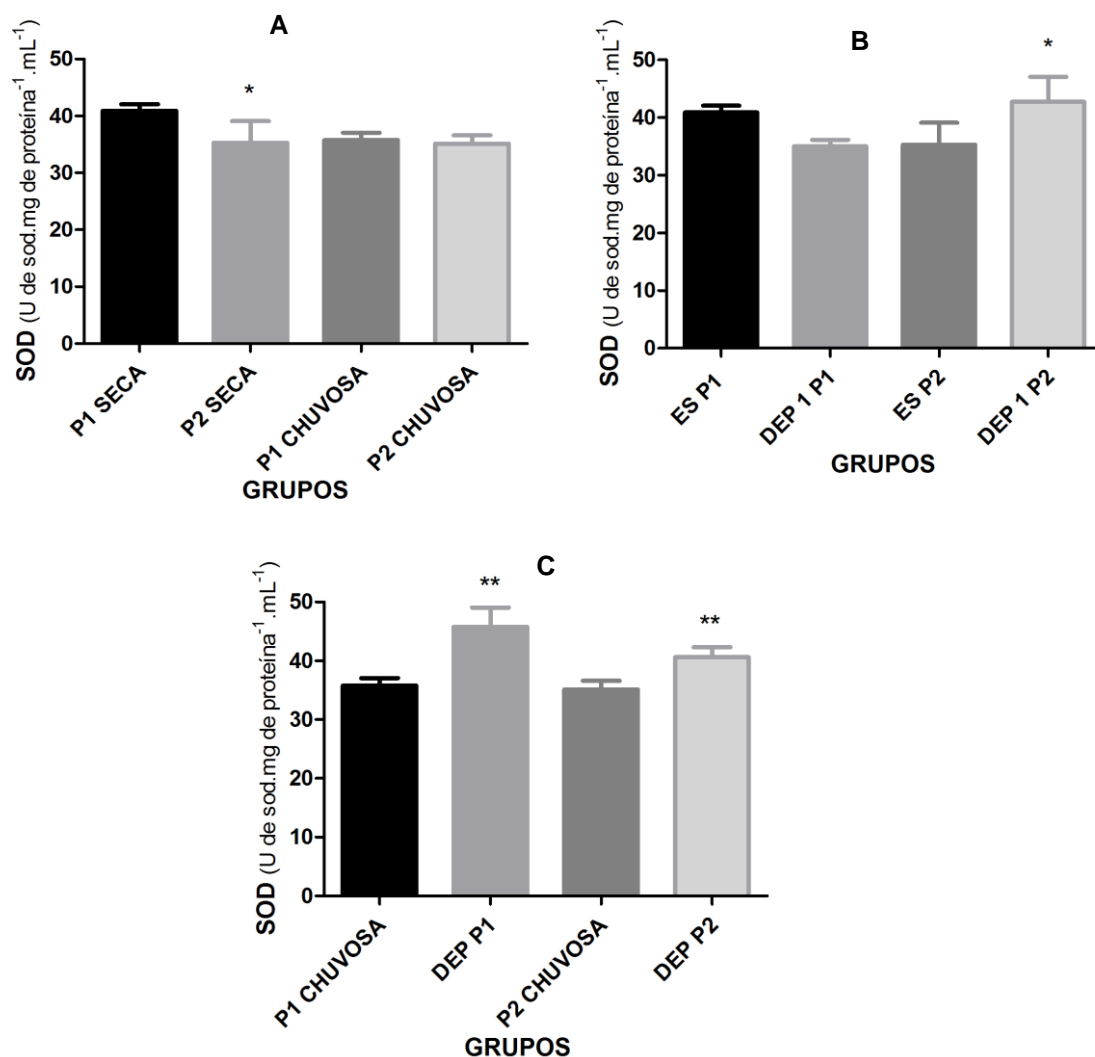


FIGURA 14: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Superóxido dismutase (SOD) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney *U*-test ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa.

A atividade da catalase (CAT) foi maior na estação chuvosa ($t\text{-test}=4,338$, $df=8$, $p=0,0025$; $t\text{-test}=2,260$, $df=9$, $p=0,050$). O grupo depuração da estação chuvosa ponto 2 foi maior que seu grupo local, além de existir diferença entre o ponto 1 e o ponto 2 da estação seca ($t\text{-test}=3,535$, $df=8$, $p=0,0077$; $t\text{-test}=2,539$, $df=9$, $p=0,0317$) (FIGURA 15).

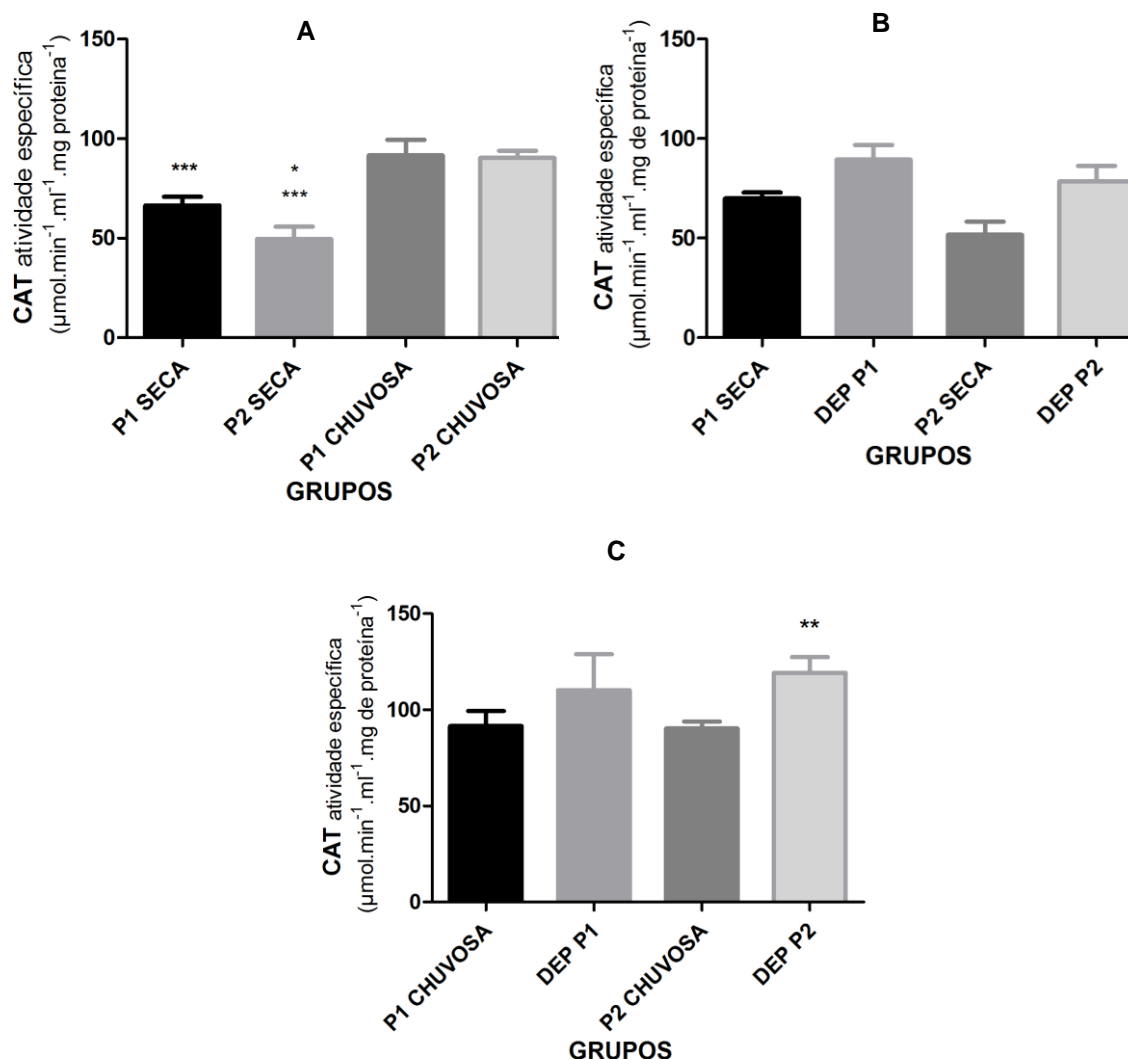


FIGURA 15: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Catalase (CAT) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney U -test ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa. ***Diferença estatística entre os pontos (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

Para a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) os “grupos depuração” foram maiores que os “grupos local”, exceto o grupo depuração ponto 2 da estação seca (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0149$; $p=0,0447$; $t\text{-test}=3,463$, $df=6$, $p=0,0134$) (FIGURA 16).

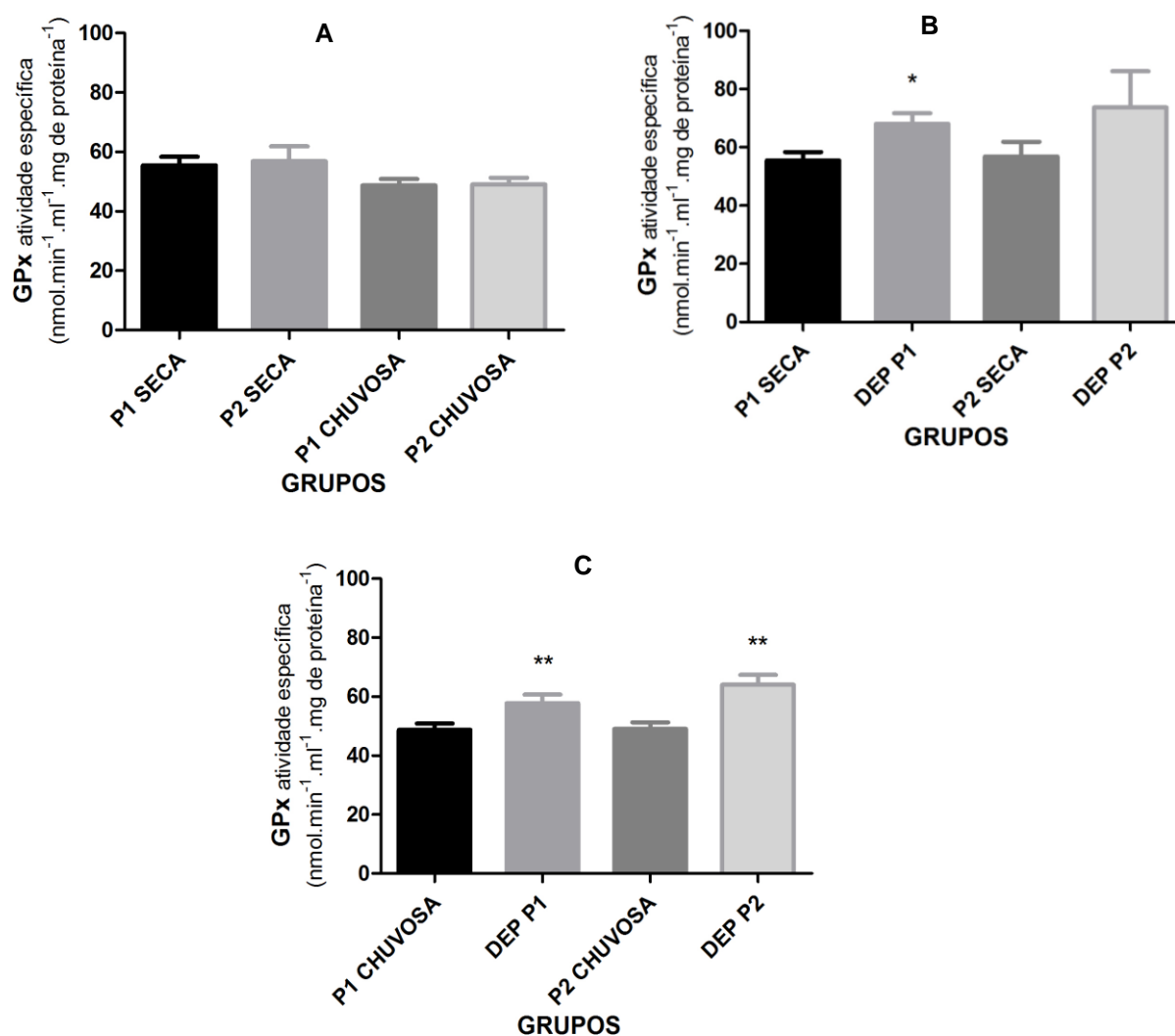


FIGURA 16: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Glutathiona peroxidase (GPx) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney *U*-test ($p<0,05$). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa.

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) no ponto 1 da estação chuvosa foi maior que o ponto 1 na estação seca (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0498$). Já os “grupos depuração” de ambas as estações apresentaram a concentração de GSH maior que os “grupos local”(Mann-Whitney *U*-test, $p<0,0001$; $p=0,0364$; $p=0,0035$; $p=0,0115$) (FIGURA 17).

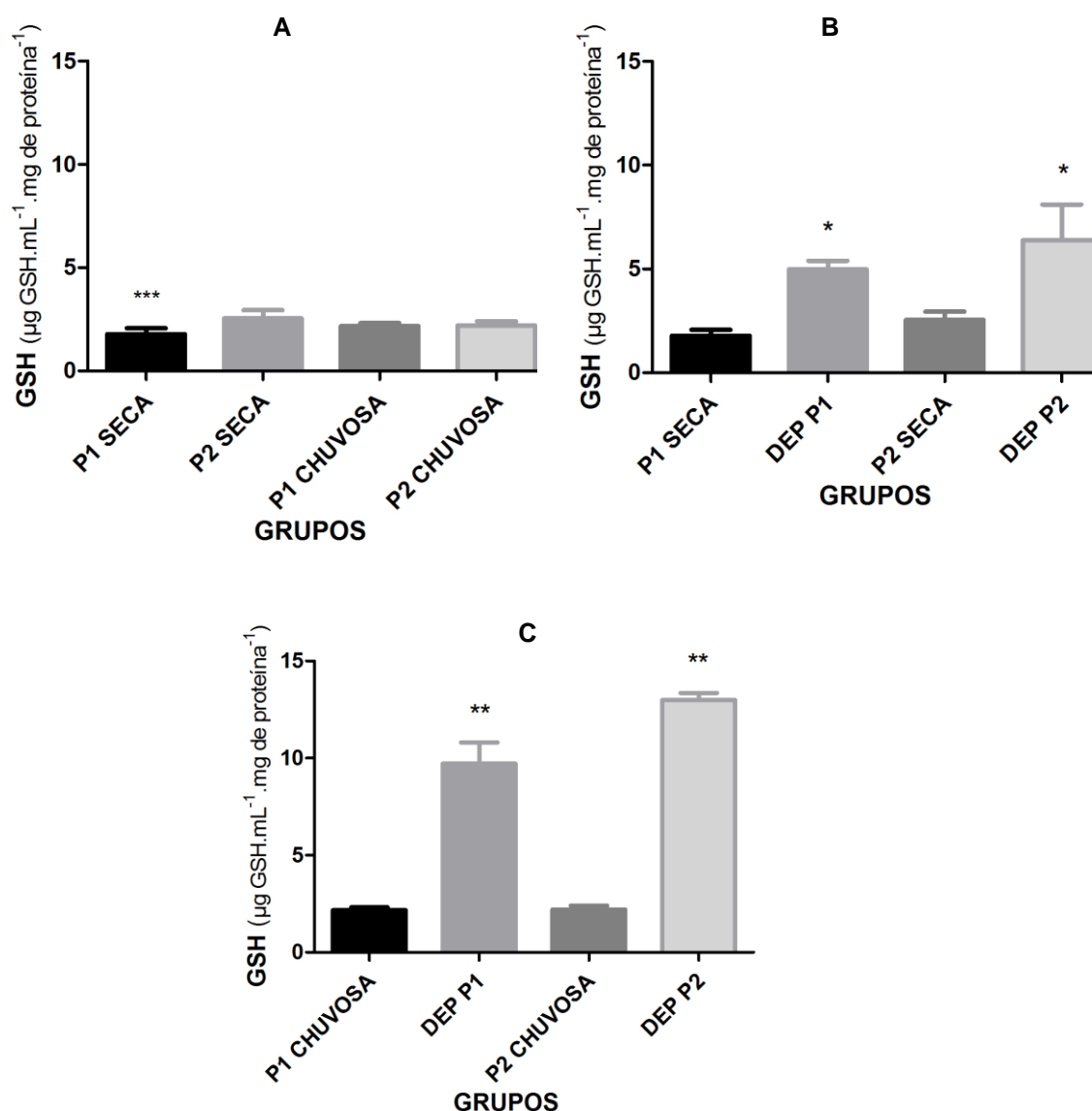


FIGURA 17: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Glutathiona reduzida (GSH) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney *U*-test ($p<0,05$). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa. ***Diferença estatística entre os pontos (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

A lipoperoxidação lipídica (LPO) não apresentou diferença entre as estações, porém os “grupos local” foram maiores que os “grupos depuração” em ambas as estações (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0017$; t -test=6,722, $df=2$, $p=0,0214$; Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0174$; $p<0,0001$) (FIGURA 18).

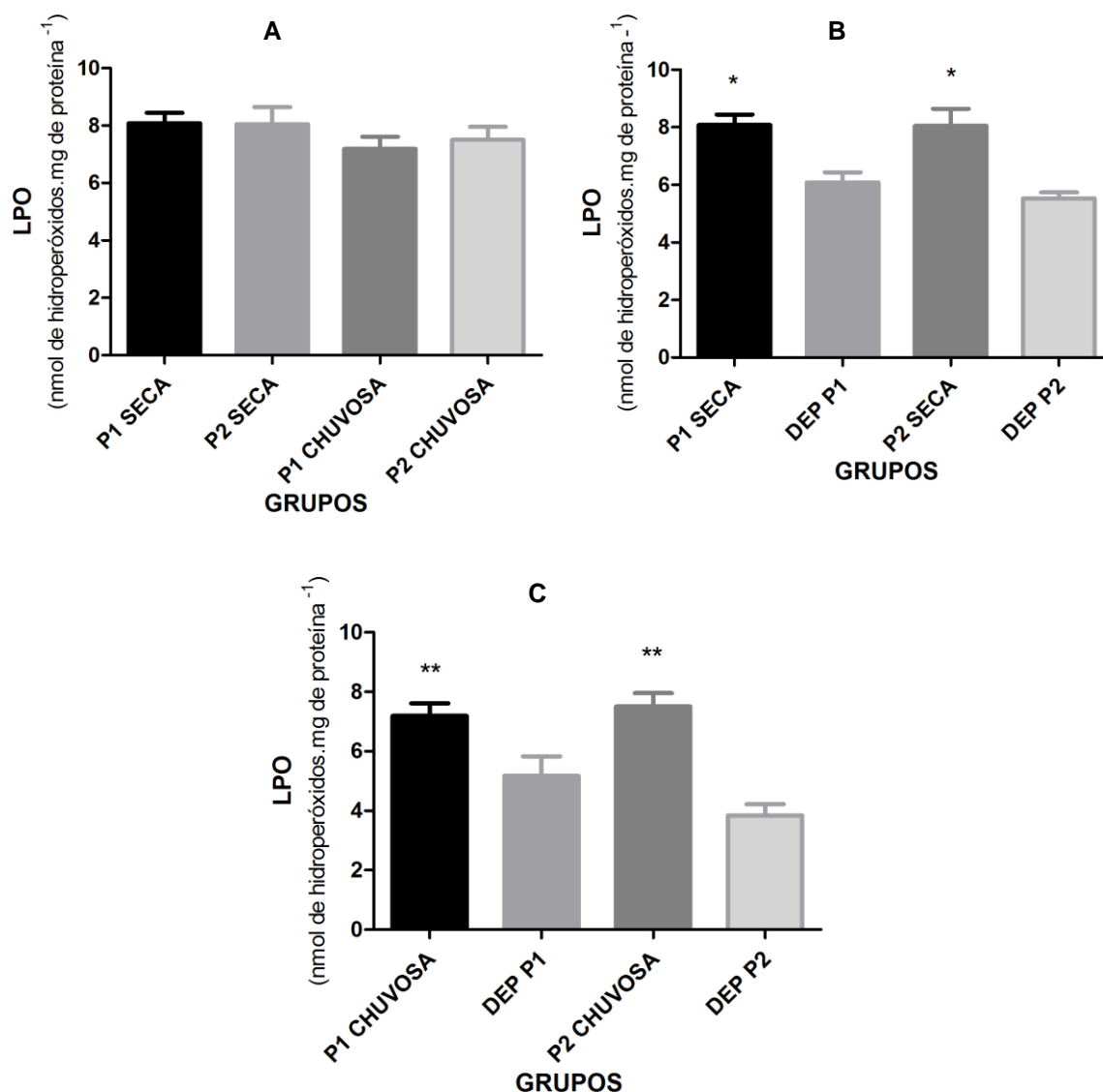


FIGURA 18: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Lipoperoxidação lipídica (LPO) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão//mediana. Test *t* e Mann-Whitney *U*-test ($p<0,05$). *Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca. **Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa.

A carbonilação de proteínas (PCO) não apresentou diferença entre os grupos em ambas as estações (FIGURA 19).

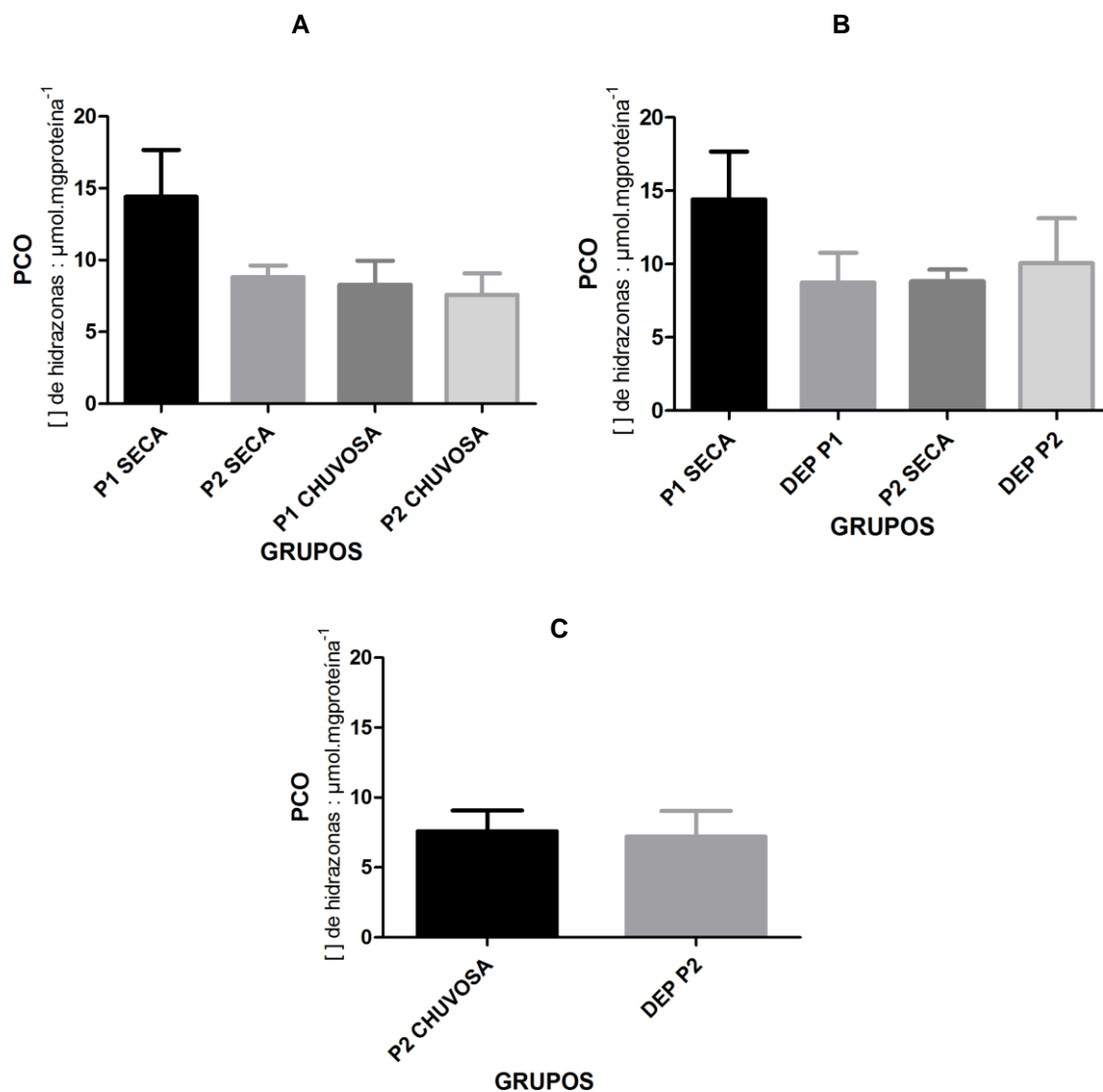


FIGURA 19: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Geophagus brasiliensis*. Carbonilação de proteínas (PCO) **A**, **B** e **C**. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão/mediana. Test t e Mann-Whitney *U*-test ($p < 0,05$).

5.5 Biomarcadores genéticos

5.5.1 Genotoxicidade

Para o teste do Micronúcleo Píscio foram analisados a formação de micronúcleos nos eritrócitos, alterações morfológicas nucleares do tipo blebbed, vaculotes e notched, além da porcentagem de eritrócitos policromáticos. A frequência de micronúcleos nas células sanguíneas dos peixes foi muito baixa e na maioria das vezes inexistente. Não houve diferença entre os grupos em relação à quantidade de micronúcleos.

Para a alteração morfológica tipo blebbed o ponto 2 da estação seca apresentou uma maior frequência que o ponto 2 da estação chuvosa (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0237$). No ponto 1 da estação chuvosa houve maior quantidade de alterações que o ponto 2 da mesma estação (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0386$). O “grupo depuração” ponto 1 da estação chuvosa apresentou uma diminuição na frequência de alterações (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0385$).

A alteração do tipo notched apresentou maior frequência no ponto 1 em relação ao ponto 2 da estação seca (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0375$). Apesar da ocorrência de diferenças estatísticas entre alguns grupos do estudo, quando comparamos o total de todas as alterações morfológicas nucleares (AMN) não observamos diferenças entre os grupos.

Para os eritrócitos policromáticos (PCE), no ponto 1 da estação chuvosa a frequência de presença foi maior que o ponto 1 da estação seca (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0395$). No “grupo depuração” ponto 1 da estação chuvosa foi observada a diminuição na quantidade de PCE (Mann-Whitney *U*-test, $p=0,0079$) (TABELA 9).

TABELA 9: MICRONÚCLEO PÍSCIO E ALTERAÇÕES NUCLEARES DOS PEIXES *Geophagus brasiliensis*

GRUPOS	MN	BLEBBED	VACULOTED	NOTCHED	AMN	PCE (%)
SECA P1	0(0;1)	4(2,7;87)	0(0;0)	20,5(12;25)*	24(18;35)	0,15(0,0;0,4)
SECA P2	1(0;2)	5,5(4;11,5)***	1(0,5;3,5)	13(8,7;15,5)	19(14;31)	0,3(0,2;0,4)
DEP P1	0(0;0)	4(4;16)	2(1;3)	28(20;46)	40(25;56)	0,05(0;0,7)
DEP P2	0(0;0)	5(0;9)	0(0;2)	17(12;86)	26(12;93)	1,3(0,4;3,2)
CHUVOSA P1	0(0;0)	5(2;10)*	0(0;1)	16(11;24)	19(15;34)	1,5(0,1;2,6)** ***
CHUVOSA P2	0(0;0)	2(0;4)	0(0;1)	11(7;25)	17(9;29)	0,2(0;1,5)
DEP P1	0(0;0)	3(1;4)**	0(0;2)	14(10;19)	18(13;21)	0,1(0;0,15)
DEP P2	0(0;0)	3(0;6)	0(0;0)	17(9;27)	20(11;32)	0,15(0;0,35)

Os dados foram expressos em mediana (Q1;Q3)

MN: Micronúcleo Píscio

AMN: Alterações Morfológicas Nucleares

PCE: Eritrócitos Policlômáticos

*Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação seca e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação seca.

**Diferença estatística entre os pontos (P1-P2) da estação chuvosa e entre os pontos e os grupos depuração (P1-DEP P1)(P2-DEP P2) da estação chuvosa.

***Diferença estatística entre os pontos (P1-P1)(P2-P2) entre as estações.

6 DISCUSSÃO

6.1 Cianobactérias

A cianobactéria dominante no reservatório Alagados foi *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em todas as estações, a densidade desta cianobactéria esteve acima de 20.000 céls/mL, valor máximo aceitável pela OMS para águas de contato primário e estabelecido como limite aceitável no ponto de captação de água para consumo humano (Portaria nº 2914 Ministério da saúde, 2011). Em março (verão), no ponto mais próximo da captação de água para abastecimento, densidade em torno de 1,000.000 céls/mL de *C. raciborskii* foi observada, cinquenta vezes maior que o estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde. Já no inverno e na primavera, as maiores densidades foram encontradas no ponto 3 e, no outono, no ponto 2. No Brasil, as cepas encontradas e analisadas são produtoras de PSTs, sendo que Lagos (1999) foi o primeiro a evidenciar cepas de *C. raciborskii* produtoras de PSTs em dois reservatórios de São Paulo. Em outros países as cepas desta espécie podem produzir cilindrospermopsina (PADISÁK, 1997).

As florações de *C. raciborskii* são mais preocupantes que as de outras cianobactérias e precisam de uma maior atenção de monitoramento. Esta cianobactéria apresenta uma ecologia diferente com habilidade de regular a posição na coluna da água (PADISÁK, 1997). Desta maneira, as florações de *C. raciborskii* podem passar despercebidas pela população e são um grande problema em locais onde o monitoramento é precário. Devido estas características, o monitoramento de regiões de abastecimento público de água, assim como regiões de intenso uso para recreação e pesca é de extrema necessidade.

A estação em que a densidade de *C. raciborskii* esteve maior foi no verão (março) em torno de 1,000.000 céls/mL no ponto 1 e 400,000 céls/mL no ponto 2 e 3. Neste período, a temperatura da água esteve maior (26°C) em relação as demais estações. Esta espécie de cianobactéria tem preferência por ambientes mais quentes. Em regiões onde ocorrem verões mais amenos e frios, o crescimento de florações é impedido ou ocorre em uma intensidade menor (PADISÁK, 1997).

O outono (maio) apresentou a segunda maior densidade de *C. raciborskii*, em média 300.000 céls/mL nos 3 pontos, porém a temperatura (19,7°C) foi menor que

na primavera (novembro) (25,4°C) segunda estação com a menor densidade da espécie. A maior densidade no outono (maio) em relação à primavera (novembro) pode não ter sido resultado da temperatura, mas de outros fatores ambientais, como por exemplo o pH. O pH é um importante fator de crescimento para o fitoplâncton. *C. raciborskii* não tolera ambientes ácidos, sendo o pH ótimo para o crescimento da espécie entre 8,0-9,0 (PADISÁK, 1997). Porém, no Lago Paranoá, já foram evidenciadas florações que permaneceram em pH entre 6,0-10,0 (BRANCO; SENNA, 1991). No outono (maio), a média do pH na água foi de 8,0 e na primavera (novembro) 7,0, isto pode justificar a maior densidade no outono, porém outros fatores ambientais podem estar envolvidos.

Outros estudos também evidenciaram a presença de florações de *C. raciborskii* ao longo das quatro estações do ano no reservatório Alagados, estando a densidade sempre acima do estabelecido pela legislação (YUNES *et al.*, 2003, 2005; IAP, 2007; CLEMENTE *et al.*, 2010; WOJCIECHOWSKI, 2013). Apesar de seguir o mesmo padrão de florações, em nenhum dos anos anteriores foi evidenciada uma densidade como a do atual estudo.

Desde 2002 até 2011, o ano em que foram registradas as maiores densidades de *C. raciborskii* foi o ano de 2006, atingindo 867,721 céls/mL no verão (dezembro) (Dados compilados de IAP, 2007; CLEMENTE *et al.*, 2010; WOJCIECHOWSKI, 2013).

A partir dos últimos anos as densidades de cianobactérias no reservatório começaram a diminuir, não ultrapassando 400,000 céls/mL no período de 2008 à 2011 (IAP, 2007; CLEMENTE *et al.*, 2010; WOJCIECHOWSKI, 2013). Apesar da diminuição evidenciada, as densidades permaneceram acima do estabelecido pela legislação pelo menos em uma estação do ano. O monitoramento contínuo da região se faz necessário, visto que existe uma grande variação nas intensidades das florações ao longo dos anos e ao longo do corpo hídrico. Também se fazem necessárias medidas de prevenção de futuras florações, além de um melhor conhecimento sobre as causas da variação sazonal de florações no reservatório Alagados.

Outras duas cianobactérias também apresentaram densidades acima do estabelecido pela legislação 2914/2011, sendo elas *Aphanizomenon* sp. e *Dolichospermum planctonicum*. *Aphanizomenon* sp. foi a cianobactéria que apresentou maior densidade, depois de *C. raciborskii*, chegando a 93,000 céls/mL

no verão, não estando presente no reservatório apenas no inverno (setembro). Este gênero também é considerado potencialmente tóxico, podendo produzir neurotoxinas. Estudos relatam que a espécie *Aphanizomenon gracile*, pode apresentar uma estável produção de saxitoxina em uma faixa de temperatura de 15°C à 28°C. A presença destas cianobactérias em corpos d'água com a ocorrência com outras cianobactérias potencialmente tóxicas, pode intensificar o risco de contaminação (CASERO *et al.*, 2014; LEDREUX *et al.*, 2010). Outra espécie do gênero como a *Aphanizomenon issatschenkoi* tem o potencial de produzir anatoxina (BALLOT *et al.*, 2010; SELWOOD *et al.*, 2007).

A *D. planctonicum* já foi evidenciada no reservatório Alagados, porém não formando florações (WOJCIECHOWSKI, 2013). Esta espécie tem o potencial de produzir microcistina e anatoxina-a. A anatoxina é uma neurotoxina que atua no sistema nervoso inibindo a atividade da acetilcolinesterase (MAHMOOD; CARMICHAEL, 1987), podendo causar convulsões e até a morte por parada respiratória (BALLOT *et al.*, 2010). A exposição de rotíferos e cladóceros ao extrato de *D. planctonicum* mostrou um significativo efeito negativo no crescimento, sobrevivência e reprodução (BARRIOS; SARMA, 2014). Porém, apenas com a evidenciação das florações destas cianobactérias no reservatório não é possível afirmar a produção de toxinas, isso depende da cepa e das condições ambientais as quais elas são submetidas. Por isso, a presença de uma cianobactéria é apenas um indicativo da produção de toxinas, sendo necessária uma análise química da água para confirmar a produção de cianotoxinas.

6.2 PSTs

As PSTs evidenciadas nas amostras de água do reservatório Alagados são neurotoxinas produzidas por *C. raciborskii*, sendo elas a saxitoxina, neosaxitoxina e goniautoxinas 1, 2, e 3. A concentração do equivalente de saxitoxinas foi maior que o valor máximo permitido (VMP) pela legislação 2914/2011 para água de consumo humano (3 µg/L equiv. STX) no inverno, verão e outono.

Apesar desta água não ser diretamente destinada ao abastecimento público, ou seja, ela passa por um tratamento antes de chegar à população, Alagados é um local de intensa recreação, ocupação humana e pesca. Desta maneira, quando a população está exposta à estas atividades, intoxicações podem ocorrer

acidentalmente, sendo esta a segunda principal causa de exposição à cianotoxinas (CARMICHAEL, 2012). Além disso, o consumo de peixes do local também pode ser um alvo de intoxicação, visto que a partir da presença de toxinas na água a biota local pode acumular em seus tecidos.

Apesar da densidade de *C. raciborskii* no ano de 2005 ser menor que a do atual estudo, Fernandes *et al.* (2005) evidenciaram uma alta contaminação da água na região com concentrações de STX chegando à 76,7 µg/L e 470,3 µg/L de GTX1. Estes valores alcançaram mais de dez vezes os valores atuais. Entretanto Clemente *et al.* (2010) detectaram apenas baixas concentrações de goniautoxinas não ultrapassando 0,083 µg/L na água do reservatório. De acordo com estes dados, o reservatório precisa de um monitoramento contínuo, visto a variação de concentrações de toxinas evidenciadas ao longo dos anos.

PSTs foram evidenciadas no músculo dos peixes. Todos os grupos apresentaram traços de STX e elevadas concentrações de GTX2, inclusive os organismos que foram submetidos ao experimento de depuração por 40 dias. Apesar da diferença de contaminação por PSTs entre a estação seca e chuvosa, não foi observada uma diferente acumulação por parte dos peixes, sugerindo que a taxa de acúmulo é similar ao longo das estações. O fator de condição (K) e o índice hepatossomático (IHS) foram menores na estação chuvosa, podendo sugerir um maior impacto nos organismos quando expostos a florações mais intensas.

As concentrações de toxinas no músculo dos peixes estiveram abaixo ao limite estabelecido internacionalmente para mariscos, de 80 µg de STX/100g (equiv. STX) (ANON, 1965). Entretanto, não podemos descartar a hipótese da transferência destas toxinas para outros níveis tróficos. Além disso, estudos demonstram um maior acúmulo de saxitoxinas nas vísceras e hepatopâncreas (LEVIN, 1992; KWONG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm evidenciado a bioacumulação destas toxinas nos tecidos de mariscos, mexilhões (SHIMIZU; YOSHIOKA, 1981; BRICELJ; SHUMWAY, 1998; PEREIRA *et al.*, 2004), carangueijos (LLEWELLYN *et al.*, 2002; OIKAWA *et al.*, 2002) e peixes (MONTROYA *et al.*, 1997; GUBBINS *et al.*, 2000). Em *Daphia magna*, a bioacumulação ocorre em 12 horas de exposição, sendo este organismo considerado como um vetor para a transferência destas toxinas ao longo da cadeia alimentar (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Em humanos casos de intoxicações foram

registrados nos EUA e Austrália, a partir da água de abastecimento público e na Indonésia e Patagônia após o consumo de peixes e bivalves, os quais tinham acumulado PSTs em seus tecidos, resultando em casos letais (GARCÍA, *et al.*, 2004; DEEDS *et al.*, 2008; CARMICHAEL, 2012). Outras cianotoxinas como a cilindrospermopsina e microcistina já mostraram serem reduzidas em organismos aquáticos quando submetidos a alguns métodos de cozimento (GUTIÉRREZ-PRAENA *et al.*, 2013).

De acordo com os resultados de PSTs no músculo dos peixes, é possível analisar um padrão na diminuição da porcentagem de peixes com a presença de STX dos “grupos local” em relação aos “grupos depuração”, evidenciando uma possível eliminação da toxina. Apesar da evidência de depuração, uma porcentagem dos peixes ainda apresenta traços de STX em seus tecidos.

O contrário é visto quando a toxina analisada é a GTX2, sendo que o padrão evidenciado foi de aumento na porcentagem de peixes com a presença da toxina, exceto para o “grupo depuração” ponto 2 da estação chuvosa. Também ocorreu o aumento de 9 vezes da concentração da toxina no grupo depuração. Clemente *et al.* (2010) também evidenciaram o aumento da concentração de GTX no músculo de peixes depois de 20 dias de depuração. Desta maneira, é proposto que esteja ocorrendo a transformação de STX em GTX2, aumentando a concentração de GTX2 nos indivíduos que foram submetidos ao experimento de depuração. Outros autores também propõem a transformação de STX em GTX2, evidenciando a diminuição de STX e o aumento de GTX2 (SULLIVAN; IWAOKA; LISTON, 1983; CASTRO *et al.*, 2004). Sako *et al.* (2000) propõem hipoteticamente uma via de transformação de PSTs com a participação de enzimas sulfotransferases. A STX pode ser precursor da GTX2 e GTX3 pela oxidação e ação da O-sulfotransferase, podendo depois estas variantes serem convertidas em C1 e C2.

Entretanto, outros estudos evidenciam o inverso, tendo a STX como produto final (JONES; NEGRI, 1997; SAKAMOTO *et al.*, 2000; SAMSUR *et al.*, 2006). As transformações de PSTs resultam no aumento ou na diminuição da toxicidade da variante, a perda do grupamento sulfato tendo como produto final a STX é o caminho que resulta no aumento da toxicidade. Portanto, nossos resultados propõem a ocorrência de transformação em que a toxicidade é diminuída.

Mesmo com a evidência da diminuição da toxicidade, após 40 dias de depuração os peixes ainda apresentaram toxinas em seus tecidos. É possível que o

tempo de depuração não tenha sido suficiente para a eliminação total de toxinas. Jones e Negri (1997) evidenciaram a persistência de GTX2 e GTX3 após 46 dias em água destilada e Nassem (1996) sugere que a ligação de saxitoxinas ao músculo pode ser irreversível.

6.3 Biomarcadores bioquímicos

Os resultados demonstraram diferença pontual e sazonal na saúde dos peixes em relação às análises dos biomarcadores. Os peixes que foram submetidos ao experimento de depuração também apresentaram diferenças em relação aos “grupos local”.

6.3.1 Neurotoxicidade

A diminuição da atividade da AChE cerebral e muscular foi evidenciada nos pontos de coleta e na estação onde a contaminação pela *C. raciborskii* e PSTs foram menores. Isto sugere que existam outros agentes anticolinesterásicos que sejam responsáveis pela diminuição da atividade da enzima. Molica *et al.* (2005) observou a diminuição da atividade da AChE na presença da anatoxina, porém, o mesmo não foi visto para a saxitoxina. Quando os peixes ficaram 40 dias em água limpa a atividade da enzima aumentou, sugerindo que o reservatório tem a presença de outros contaminantes que estejam mantendo a atividade da AChE reduzida. Como o entorno do reservatório é amplamente utilizado para a agricultura, existe grande possibilidade da presença de pesticidas na água, sendo estes compostos considerados anticolinesterásicos (CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2005; GUILOSKI *et al.*, 2013).

A diminuição da atividade da enzima no ponto 2 pode ser explicada por ser a área mais próxima da região com prática agrícola e a diminuição da atividade na estação seca pelo acúmulo de contaminantes devido ao baixo volume de água.

6.3.2 Biotransformação/estresse oxidativo

Neste trabalho o aumento da atividade da EROD coincidiu com o período de maior contaminação por parte das cianotoxinas, que foi na estação chuvosa. Porém,

não é o mesmo padrão evidenciado para a AChE, catalase e GST, as quais demonstram alterações por compostos estressores na estação seca, período em que a contaminação por cianotoxinas encontrava-se menos elevada. Por outro lado, a mistura de contaminantes pode estar mais concentrada. Desta maneira, a EROD pode ser um biomarcador mais sensível para as cianotoxinas, enquanto os demais biomarcadores sejam mais facilmente alterados por outros compostos disponíveis no reservatório. Gubbins *et al.* (2000) sugerem a indução do citocromo P450 (CYP1A) em peixes expostos as saxitoxinas. A diminuição da atividade da enzima no “grupo depuração” sugere a diminuição da biotransformação devido à ausência de compostos indutores de estresse.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi maior no ponto 1 da estação seca em relação ao ponto 1 da estação chuvosa e todos os “grupos depuração” mostraram uma diminuição na atividade da enzima. Nossos resultados demonstram um aumento da atividade da enzima nos peixes que provavelmente estão expostos à contaminantes no reservatório.

Outros estudos que avaliaram a atividade da enzima em peixes expostos à contaminantes como a saxitoxina, PCBs e PHAs, relataram diferentes comportamentos da cinética da GST, como o aumento da atividade (ANDERSSON; PESONEN; JOHANSSON, 1985; OTTO; MOON, 1995; CHOI *et al.*, 2006; CLEMENTE *et al.*, 2010), a diminuição da atividade (SILVA *et al.*, 2011) ou não sofrendo alterações (SILVA DE ASSIS *et al.*, 2013). Nos “grupos depuração” a atividade da GST diminuiu, sugerindo a redução na conjugação de compostos quando os peixes foram mantidos em água limpa.

A catalase (CAT) que é uma enzima que faz a degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, foi menor na estação seca em relação à estação chuvosa e a depuração da estação chuvosa do ponto 2 foi maior que seu grupo local. Apesar da atividade dos outros “grupos depuração” não apresentarem diferenças significativas em relação aos “grupos local”, todas as depurações demonstraram uma tendência ao aumento da atividade da enzima, sugerindo a recuperação do sistema antioxidante.

Estes resultados demonstram que pode estar ocorrendo a redução da catalase nos peixes dos “grupos local”. Outros estudos identificaram que alguns xenobióticos como PAHs, TCB (triclorobenzeno) e até mesmo as saxitoxinas podem diminuir a atividade da enzima (OTTO; MOON, 1995; ROMEO *et al.*, 2000; SILVA *et*

al., 2011). A diminuição é mais acentuada na mesma estação e no mesmo ponto que ocorreu a diminuição da AChE, podendo ser causada pelos mesmos xenobióticos.

A atividade da Glutathione peroxidase (GPx) evidenciada nos peixes, segue o padrão da catalase apresentando uma diminuição nos “grupos local” e aumento nos “grupos depuração”. Estudos também encontraram a diminuição da atividade da GPx em organismos expostos a contaminantes (SILVA *et al.*, 2011; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A GPx utiliza a glutathione reduzida (GSH) como cofator, isso explica os valores de GSH também estarem mais altos nos “grupos depuração”.

A GPx tem um papel muito importante na proteção das membranas celulares, evitando o dano que pode ser causado pela lipoperoxidação (LPO). Desta maneira, a diminuição na atividade desta enzima pode causar o aumento no dano de moléculas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os resultados da pesquisa demonstraram que nos “grupos local”, onde ocorre a diminuição da GPx, os níveis de LPO são maiores. O inverso foi encontrado nos “grupos depuração”. Sendo assim, os peixes do reservatório Alagados sofrem uma deficiência no sistema antioxidante causado por agentes externos, resultando no dano lipídico e estes níveis de dano podem ser recuperados se estes animais não forem expostos novamente a condições de estresse.

Segundo Guzmán-Guillén *et al.* (2014) e Sun *et al.* (2006) a redução no dano celular pode ocorrer devido: a eliminação de contaminantes bioacumulados nos tecidos dos organismos; diminuição de radicais livres através da defesa antioxidante; e retorno dos níveis normais de radicais. No presente estudo, podemos sugerir que a redução do dano tenha ocorrido pelos mesmos mecanismos.

O mesmo não foi evidenciado para o dano proteico (PCO), pois não ocorreu diferença entre os grupos. Não é possível afirmar que o dano não esteja ocorrendo. Relatos na literatura evidenciam que a recuperação de danos em proteínas, em relação aos danos lipídicos, podem levar mais tempo para ocorrer em peixes (GUZMÁN-GUILLÉN *et al.*, 2014).

6.4 Genotoxicidade

A quantidade de micronúcleos foi quase que inexistente, estando presente em

poucos peixes. Porém os resultados sugerem que os peixes estão expostos à condições que resultam em citogenotoxicidade, devido ao aumento de alterações morfológicas nucleares do tipo blebbed e notched. Melegari (2010) em estudo da exposição à STX (24 horas) observou o aumento da quantidade de micronúcleos em células neurais de camundongos. Porém para eritrócitos de peixes que foram expostos à contaminantes, estudos demonstram a ausência de micronúcleos, sugerindo baixa sensibilidade deste biomarcador (GRISOLIA; STARLING, 2000; ABRAMSSON-ZETTERBERG; SUNDH; MATTSSON, 2010; COSTA et al., 2012; ARCAUTE *et al.*, 2014).

A estação chuvosa foi a que apresentou indivíduos com maior quantidade para o tipo de alteração blebbed, isso pode ser devido a maior contaminação por cianotoxinas nesta estação. Contudo, os resultados de alguns biomarcadores bioquímicos mostraram uma maior alteração na estação seca.

Costa *et al.* (2011), demonstraram aumento de anormalidades nucleares do tipo blebbed em eritrócitos de peixes, os quais foram expostos a STX por injeções intracelomáticas. A partir de dois dias de exposição as alterações já se mostraram significativas. Guilherme *et al.* (2014), também relataram que as alterações morfológicas nucleares, como a do tipo blebbed, apresentam maior frequência nas células de peixes pois são mais sensíveis que a formação de micronúcleos. Apesar dos mecanismos que resultam nas alterações morfológicas nucleares ainda não serem totalmente compreendidos, o uso de diferentes tipos de alterações são vistas como vantajosas, pois além de demonstrar efeitos citotóxicos que podem estar ocorrendo mesmo em contaminações mais discretas, elas servem como ferramentas complementares em ensaios genéticos.

O “grupo depuração” ponto 1 da estação chuvosa demonstrou uma redução na quantidade de alterações do tipo blebbed, sugerindo uma recuperação no dano genético após 40 dias em água limpa.

As alterações do tipo notched foram detectadas em todos os grupos, porém os grupos que apresentaram diferença estatística foram o ponto 1 e o ponto 2 da estação seca. O ponto 1 foi o que teve maior quantidade de alterações, sendo que para a alteração do tipo blebbed o resultado foi inverso.

Os resultados para a frequência de eritrócitos policromáticos foram similares aos encontrados para a alteração tipo blebbed. São chamados de eritrócitos policromáticos (PCE) os eritrócitos imaturos ou jovens e a sua frequência pode

determinar a taxa de formação de eritrócitos (CAVAS; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005). Nossos resultados sugerem que as condições no reservatório estão causando o aumento de eritrócitos policromáticos, visto que após 40 dias em água limpa a frequência destas células diminui. Os contaminantes podem agir sobre os tecidos hematopoiéticos como por exemplo o rim, afetando a formação de eritrócitos. O aumento dos PCE pode ser uma forma de defesa utilizada pelos peixes.

Visto que o reservatório Alagados é destinado ao abastecimento público de água e existe intensa recreação no local, a contaminação deste corpo hídrico gera um alerta de risco à integridade do ecossistema e a saúde humana.

7 CONCLUSÃO

O reservatório Alagados apresenta uma persistente contaminação por cianotoxinas e florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*, estando a densidade sempre acima do estabelecido pela legislação. Além disso, a concentração de equivalente de STX atinge valores superiores ao permitido pelo Ministério da Saúde.

Os peixes estão acumulando PSTs no músculo e, mesmo após 40 dias em água limpa, a depuração destas toxinas não ocorre por completo.

Observou-se uma variação sazonal e pontual nas respostas dos peixes aos biomarcadores, sendo que as condições do ambiente resultam em dano lipídico e genético.

Os peixes conseguiram recuperar as respostas do sistema antioxidante após o período de 40 dias em água limpa com redução do dano celular. Isto indica que outros contaminantes, além das cianotoxinas, estão presentes no reservatório, sendo as respostas um reflexo de uma mistura destes.

REFERÊNCIAS

- ABELHA, M. C. F.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26(1), p. 37-45, 2004.
- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; SUNDH, U. B.; MATTSSON, R. Cyanobacterial extracts and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay *in vivo* and *in vitro*. **Mutation Research**, v. 699, p. 5-10, 2010.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- ANDERSSON, T.; PESONEN, M.; JOHANSSON, C. Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of rainbow trout by b-naphthoflavone or Clophen A50. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 3309-3314, 1985.
- ANDRINOLO, D., IGLESIAS, V., GARCIA, C., LAGOS, N. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. **Toxicon**, v. 40, p. 699–709, 2002.
- ANDRINOLO, D.; SANTINELLI, N.; OTAÑO, S.; SASTRE, V.; LAGOS, N. Paralytic shellfish toxins in mussels and Alexandrium tamarense at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia Argentina: kinetic of a natural depuration. **Journal of Shellfish Research**, v. 18, p. 203–209, 1999.
- ANON. **Nacional shellfish sanitation program, manual of operation, part 1: Sanitation of shellfish growing areas**, Washington, DC, US Department of health, education and welfare. v. 9, p. 19-20, 1965.
- ARAÓZ, R., MOLGO, J., MARSAC, N.T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 813–828, 2010.
- ARCAUTE, C. R.; PÉREZ-INGLESÍAS; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 632-639, 2014.
- BALLOT, A.; FASTNER, J.; LENTZ, M.; WIEDNER, C. First report of anatoxin a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. **Toxicon**, v.56, p. 964–971, 2010.
- BARRIOS, A. Z.; NANDINI, S.; SARMA, S. S. S. Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Platyonus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera). **Ecotoxicology**, Oct. 10, 2014.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições.** São Carlos: Ed. Rima, p. 489, 2005.

BORGA, K.; SOUZA, A. V. Biomagnification of organochlorides along a bays sea food chain. **Environmental Pollution**, London, v. 113, n. 2, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1, p.248-254, 1976.

BRANCO, C. W. C.; SENNA, P.A. C. The taxonomic elucidation of the Pananoa Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, v. 61, p. 85–91, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 8 2.914 de 12 de dezembro de 2011.** Diário Oficial da União, n. 8239, seção 1, 2011.

BRIAND, J. F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBERAS, C.; HUMBERT, J.F.; COUTÉ, A.; BERNARD, C. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, vol. 36, p. 3183-92, 2002.

BRIAND, J.F., JACQUET, S., BERNARD, C., HUMBERT, J.F. Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**, v. 34, p. 361–377, 2003.

BRICELJ, V. M.; SHUMWAY, S. E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. **Reviews in Fisheries Science**, v. 6, p.315-383, 1998.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, p. 583-585, 1971.

BYTH, S. Palm Island mystery disease. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 40–42, 1980.

CARMICHAEL, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 7, n. 5, p. 1393-1407, 2012.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects.

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 2123 – 2136, 1990.

CASERO, M. C.; BALLOT, A.; AGHA, R.; QUESADA, A.; CIRE'S, S. Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of sxt genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile*. **Harmful Algae**, v. 37, p. 28–37, 2014.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VASQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, v. 44, p. 483–489, 2004.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569–574, 2005.

CHANDRASEKARA, H.U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 144–149, 2005.

CHOI, N. M. C.; YEUNG, L. W. Y.; SIU, W. H. L.; SO, I. M. K.; JACK, R. W.; HSIEH, D. P. H.; WU, R. S. S.; LAM, P. K. S. Relationships between tissue concentrations of paralytic shellfish toxins and antioxidative responses of clams, *Ruditapes philippinarum*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 572–597, 2006.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon E. & EN, 1999.

CLEMENTE, Z.; BUSATO, R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M.; RAMSDORF, W.; MAGALHÃES, V. F.; SILVA DE ASSIS, H.C. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a Southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v. 55, p. 396–406, 2010.

CODD, G. A.; BELL, S. G.; KAYA, K.; WARD, C. J.; BEATTIE, K. A.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, p. 405–415, 1999.

CODD, G.A., STEFFENSEN, D.A., BURCH, M.D. & BAKER, P.D. Toxic blooms of cyanobacteria in Lake Alexandrina, South Australia: learning from history. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, v. 45, p. 731–736, 1994.

COMPAGNON, D.; LEMBEYE, G.; MARCOS, N.; RUIZ-TAGLE, N.; LAGOS, N. Bioaccumulation de PSP toxins in bivalve *Aulacomia ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccium ranelliformes* during *Alexandrium catenella* bloom in the southern Chile. **Journal of Shellfish Research**, v. 17, p. 67–73, 1998.

COSTA, P. R.; PEREIRA, P.; GUILHERME, S.; BARATA, M.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M.; FERREIRA-POUSÃO, P. Hidroxybenzoate paralytic shellfish toxins

induce transient GST activity depletion and chromosomal damage in white seabream (*Diplodus Saugus*). **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 63-69, 2012.

COSTA, P. R.; PEREIRA, P.; GUILHERME, S.; BARATA, M.; NICOLAU, L.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M.; FERREIRA-POUSÃO, P. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 42-47, 2011.

CROUCH, R.K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-41, 1981.

DEEDS, J. R.; LANDSBERG, J. H.;ETHERIDGE, S. M.; PITCHER, G. C.; LONGAN, S.W. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. **Marine Drugs**, v. 6, p. 308–348, 2008.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M.A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERNANDES, L. F.; LAGOS, P. e. D.; WOSIACK, A. C.; PACHECO, C. V.; DOMINGUES, L.; ZENHDER-ALVES, L.; COQUEMALA, V.. Comunidades fitoplanctônicas em ambientes lênticos. IN: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Eds). **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar-Finep, p. 500, 2005.

FITZGERALD, D., CUNLIFFE, D., BURCH, M. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. **Environment Toxicology**, v. 14, p. 203–209, 1999.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, London, v. 18, p. 11-12, 1878.

FREITAS, M. S. **Remoção de microcistinas e saxitoxinas por meio de oxidação com hipoclorito de sódio: avaliação em escala de bancada**. Dissertação de mestrado em tecnologia ambiental e recursos hídricos. Universidade de Brasília Faculdade de Tecnologia - Departamento de engenharia civil e ambiental, 2007.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. In: **Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapia racional**. Editora Guanabara koogan, 4º ed. Rio de Janeiro, 2010.

FULTON, R. S.; PAERL, H. W. Toxic and inhibitory effects of the blue green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 9, n. 5, p. 837-855, 1987.

GARCÍA, C.; BRAVO, M. C.; LAGOS, M.; LAGOS, N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. **Toxicon**, v. 43, p. 149-158, 2004.

GOULART, M. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n. 1, 2003.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v. 491, p. 39-44, 2000.

GUBBINS, M. J.; EDDY, F. B.; GALLACHER, S.; STAGG, R. M. Paralytic Shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolizing enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 479-483, 2000.

GUILHERME, S.; SANTOS, M. A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla Anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)-the major environmental breakdown product of glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8730-8739, 2014.

GUILOSKI, I. C.; ROSSI, S. C.; SILVA, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Insecticides biomarker responses on a freshwater fish *Corydoras paleatus* (Pisces: Callichthyidae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 4, p. 272-277, 2013.

GUTIÉRRES-PRAENA, D.; JOS, Á.; PICHARDO, S.; MORENO, I. M.; CAMEÁN, A. M. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 139-152, 2013.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136–147, 2000.

GUZMÁN-GUILLÉN, R.; PRIETO, A. I.; MORENO, I.; RÍOS, V.; VASCONCELOS, V. M.; CAMEÁN, A. M. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 40–49, 2014.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of nutrition**, v. 104, n. 4, p. 580–587, 1974.

HAWKINS, P. R.; CHANDRASENA, N. R.; JONES, G. J.; HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, v. 35, p. 341-346, 1997.

HAWKINS, P. R.; RUNNEGAR, M. T. C.; JACKSON, A. R. B.; FALCONER, I. R. Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju Isolated from a Domestic Water Supply Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1292-1295, 1985.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.

18, n. 2, p. 187–190, 1973.

HILLE, B. Ionic Channels of Excitable Membranes, second ed. **Sinauer Associates Inc. Publishers**, Sunderland, Massachusetts, EUA, 605, 1992.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Laudos técnicos de análise da água do Reservatório Alagados de 2003 a 2007. Curitiba, 2007.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba: Imprensa oficial, 2004.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation research**, v. 552, p. 1-17, 2004.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xilenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; DENISE, M.C.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO, F.D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 873-878, 1998.

JONES, G.; NEGRI, A. P. Persistence and Degradation of Cyanobacterial Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) in Freshwaters. **Water Research**, v. 31, p. 525-533, 1997.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-9, 2001.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p.6183-6188, 1976.

KIM, J.-H.; DAHMS, H.-U.; RHEE, J.-S.; LEE, Y.-M.; LEE, J.; HAN, K.-N.; LEE, J.-S. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, n. 1, p. 99–106, 2010.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C.. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies**, v. 94, p. 207-222, 1999.

KUNIYOSHI, L. S. **Bioacumulação de elementos-traço e expressão de micronúcleos em *Cathorops spixii* (biomonitor) como ferramentas de avaliação da influência antrópica em dois setores do complexo estuarino-lagunar de Cananéia- Iguape, São Paulo, Brasil.** Dissertação, Universidade de São Paulo,

Oceanografia Química e Geográfica. 2011.

KWONG, R. W. M.; WANG, W.; LAM, P. K. S.; YU, P. K. N. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 82-91, 2006.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. Q.; OSHIMA I. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LAGOS, P. E. D. **Cianobactérias no Reservatório Iraí, PR: Variação temporal e forçantes ambientais**. Dissertação (Mestrado) Departamento de Botânica – Universidade Federal do Paraná, 2008.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182–186, 2003.

LEDREUX, A.; THOMAZEAU, S.; CATHERINE, A.; DUVAL, C.; YÉPRÉMIAN, C.; MARIE, A.; BERNARD, C. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. **Harmful Algae**, v. 10, p. 88–97, 2010.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 411, p. 43–64, 2003.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v.233, p.346-357, 1994.

LEVIN, R. E. Paralytic shellfish toxins: their origin, characteristics and methods of detection: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 405-417, 1992.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and Pollution Monitoring : Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. **Journal of Chemical and Technology and Biotechnology**, v.57, p. 195-211, 1993.

LLEWELLYN, L. E.; DODD, M. J.; ROBERTSON, A.; ERICSON, G.; DE KONING, C.; NEGRI, A.P. Post- mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aenus*. **Toxicon**, v. 40,p. 1463-1469, 2002.

LLEWELLYN, L.E. Saxitoxin, a toxic marine natural that targets a multitude of receptors. **Royal Society of Chemistry**, v. 23, p. 200–222, 2006.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* nrc-525-17. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1221-1227, 1987.

MARDONES, P.; ANDRINOLO, D.; CSENDES, A.; LAGOS, N. Permeability of

human jejunal segments to gonyautoxins measured by the Ussing chamber technique. **Toxicon**, v.44, p. 521–528, 2004.

MARIONNET, D., DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 21, p. 80-91, 2006.

MARKERT, B. **Plants as Biomonitors. Indicators for heavy Metals in the Terrestrial Environments**. VCH Publishers.; New York, 1993.

MATSUI, S. **Diretrizes para gerenciamento de lagos: Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios**. São Carlos: International institute of Ecology, p. 206, 2002.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MELEGARI, S. P. **Estudo do Mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. Tese de Doutorado, Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2010.

MEREL, S.; VILLARIN, M.; CHUNG, K.; SNYDER, S. Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. **Toxicon**, v. 76, p. 118-131, 2013.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v.3, n.4, 2002.

MIHALI, T.K., KELLMANN, R., MUENCHHOFF, J., BARROW, K.D., NEILAN, B.A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 716–722, 2008.

MITRA, S.; KESWANI, T.; DEY, M.; BHATTACHARYA, S.; SARKAR, S.; GOSWAMI, S.; GHOSH, N.; DUTTA, A.; BHATTACHARYYA, A. Cooper-induced immunotoxicity involves cell cycle and cell death in the spleen and thymus. **Toxicology**, v. 293, p. 78-88, 2012.

MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. V. C.; COSTA, A. N. S. F.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, S. M. F. O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p. 743–753, 2005.

MONTOYA, N. G.; AKSELMAN, R.; PAJARO, M.; PERROTTA, R. G.; FRANCO, J.; CARRETO, J.I. Mortandad de caballa (*Scomber japonicus*) en la plataforma bonarense (Mar Argentino) asociada a un florecimiento del dinoflagelado toxico *Alexandrium tamarense*. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, v.11, p. 145-152, 1997.

MORO, R. S. et al. Heterogeneidade espacial do fitoplâncton na represa de alagados. **Publicações UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**. Ponta Grossa: v. 1, p. 21-30, 2003.

NAKAMURA, M. & RAST, W. Guidelines for Lake Brief Management. **International Lake Environment Committee (ILEC)**, Otsu, Japan, 2011.

NASSEM, S.M. Toxicokinetics of [3H] saxitoxinol in peripheral and central nervous system of rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, p. 49-58, 1996.

NEGRI, A.P., JONES, G.J., HINDMARSH, M. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisoning toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Toxicon**, v. 33, n. 10, p. 1321-1329, 1995.

NOGUEIRA, I. C. G.; PEREIRA, P.; DIAS, E.; PFLUGMACHERD, S.; WIEGAND, C.; FRANCA, S.; VASCONCELOS, V. M. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. **Toxicon**, v. 44, p. 773-780, 2004.

NÚCLEO DE ESTUDOS EM MEIO AMBIENTE (NUCLEAM). **Bacia Hidrográfica do Manancial Alagados**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2002.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.

OIKAWA, H.; FUJITA, T.; SATOMI, M.; SUZUKI, T.; KOTANA, Y.; YANO, Y. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. **Toxicon**, v. 40, p. 1593-1599, 2002.

OSHIMA, Y. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds). **Manual on Harmful Marine Microalgae**. Paris: UNESCO, p. 81-9, 1995.

OSHIMA, Y.; BLACKBURN, S.I.; HALLEGRAEFF, G.M. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. **Marine Biology**, v. 116, p. 471-476, 1993.

OTTO, D. M. E.; MOON, T. W. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. **Pharmacology and Toxicology**, v. 77, p. 281-287, 1995.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, and expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives Hydrobiology**, vol. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PALMA, P.; ALVARENGA, P.; PALMA, V.; MATOS, C.; FERNANDES, R. M.; SOARES, A.; BARBOSA, I. R. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). **Environment Science and Pollution Research**, v. 17, p. 703-716, 2010.

PARAGUASSÚ, A. R.; ALVES, D. R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos do acará *Geophagus brasiliensis* (quoy; gaimard, 1824) (osteichthyes: cichlidae) do reservatório de lajes, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 35-39, 2005.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics, in Casarett and Doull's **Toxicology: The Basic Science of Poisons** (Klaassen CD ed), chapter 6, p. 133-224, McGraw-Hill, New York, 2001.

PEREIRA, L. S. **Efeitos do cádmio em parâmetros bioquímicos, genotóxicos, hematológicos e histológicos de *Rhamdia quelen***. Dissertação de mestrado-Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2014.

PEREIRA, P.; DIASA, E.; FRANCA, S.; PEREIRA, E.; CAROLINO, M.; VASCONCELOS, V. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 339–350, 2004.

RAMOS, P. B.; DIEHL, F.; SANTOS, J. M.; MONSERRAT, J. M.; YUNES, J. S. Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water. **Harmful Algae**, v. 37, p. 68–74, 2014.

RAST, W.; STRASKRABA, M. Water quality: The impact of eutrophication. **Lakes and Reservoirs**, v. 3, 2001.

ROCHA, D. C.; MARTINS, D. Levantamento de plantas daninhas aquáticas no reservatório de Alagados, Ponta Grossa-PR. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, 2011.

ROCHER, B.; LE GOFF, J.; PELUHET, L.; BRIAND, M.; MANDUZIO, H.; GALLOIS, J.; DEVIER, H.; GEFFARD, O.; GRICOURT, L.; AUGAGNEUR, S.; BUDZINSKI, H.; POTTIER, D.; ANDRE, V.; LEBAILLY, P.; CACHOT, J. Genotoxicant accumulation and cellular defense activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 65–77, 2006.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; FRACÁCIO, R.; PEREIRA, R. H. G.; RODRIGUES, M. H. S. Limnological and Ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê river (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 4, p. 697-710, 2005.

ROMEO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 185-194, 2000.

SAKAMOTO, S.; SATO, S.; OGATA, T.; KODAMA, M. Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. **Fisheries Science**, v. 66, p. 136–141, 2000.

SAKER, M. L.; NOGUEIRA, I. C. G.; VASCONCELOS, V. M.; NEILAN, B. A.; EAGLESHAN, G. K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters.

Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 55, p. 243-250, 2003.

SAKO, Y.; YOSHIDA, T.; UCHIDA, A.; ARAKAWA, O.; NOGUCHI, T.; ISHIDA, Y. Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 1044-1051, 2000.

SAMSUR, M.; YAMAGUCHI, Y.; SAGARA, T.; TAKATANI, T.; ARAKAWAD, O.; NOGUCHI, T. Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. **Toxicon**, v. 48, p. 323–330, 2006.

SANTOS, G. S. **Avaliação genotóxica da exposição subcrônica ao sulfato de cobre em *Rhamdia quelen* (siluriformes)**. Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9 15, 1975.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SELWOOD, A. I.; HOLLAND, P. T.; WOOD, S. A.; SMITH, K. F.; MCNABB, P. S. Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoii*. **Environment Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 506–510, 2007.

SHIMIZU, Y., YOSHIOKA, M. Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates. **Science**, v. 212, n. 1, p. 547-549, 1981.

SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, C. A.; OBA, E. T.; PAMPOLA, J. H.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RAMSDORF, W.; CESTARI, M. M. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. **Toxicon**, v. 66, p. 25–30, 2013.

SILVA DE ASSIS, H. e. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung von Gewasserverschmutzungen**. 1998, 99 f. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

SILVA, C. A.; RAMSDORF, W.; MAGALHÃES, V. F.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA, R. C. A. ;SILVA DE ASSIS, H. C. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. **Toxicon**, v. 57, p. 141-147, 2011.

SINHA, R.; PEARSON, L. A.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; ORR, P. T.; NEILAN, B. A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - is climate change responsible? **Water Research**, v. 46, p. 1408-1419, 2012.

SMITH, V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, v, 100, p. 179-196, 1999.

SULLIVAN, J.J., IWAOKA, W.T., LISTON, J. Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, p. 465–472, 1983.

SUN, Y.; YU, H.; ZHANG, J.; YIN, Y.; SHI, H.; WANG, X. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. **Chemosphere**, v. 63, p. 1319–1327, 2006.

UEDA, T.; HAYASHI M, OHTSUKA Y, NAKAMURA T, KOBAYASHI J AND SOFUNI T. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science Technology**, v. 25 no 11, p. 235-240, 1992.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton Methodik. **Limnology**, v. 5, p. 567–596, 1958.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, R. C. H.; TERRA, N. R. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 79–92, 2008.

VENRICK, E. L. How many cells to count? In: SOURNIA, A. (Ed.). **Phytoplankton manual**. Paris: Unesco, p. 167-180, 1978.

VIRGENS, A. C. DAS. **Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**. Brasil. Centro Universitário Vila Velha, 2009.

WHITE, A.W. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: Ragelis, E.P. (Ed.), **Seafood Toxins**. **American Chemical Society**, Washington, DC, p. 171-180, 1984.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; PEDROSA, R.C. & SOARES, C.H.L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 719-726, 2001.

WOJCIECHOWSKI, J. **Efeitos da Temperatura, Fósforo e Luz no crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju do reservatório de Alagados, Paraná**. Dissertação (Mestrado) Departamento de Botânica – Universidade Federal do Paraná, 2013.

WOOD, S.A; POCHONA, X.; LUTTRINGER-PLU, L.; VANT, B.N.; HAMILTON, D. P. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **Harmful Algae**, v. 39, p. 64–74, 2014.

YU, K. N.; KWONG, R. W. M.; WANG, W.; LAM, P. K. S. Biokinetics of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1031–1071, 2007.

YUNES, J. S.; CUNHA, N. T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L. A. O.; MONSERRAT, J. M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters, **Comments on Toxicology**, 9:2, 103-115, 2003.

YUNES, J. S.; MATTHIENSEN, A.; CARNEIRO, C.; OROSKI, F.; BECKER, V.; CARVALHO, M. C..Florações de Cianobactérias Tóxicas: Mãos à obra ao problema. In: MARINHO, M.; ROLAND, F.; CESAR, D.. (Eds.). **Lições de Limnologia**. RiMa: São Carlos, p. 299-323, 2005.